

ROZANY MUCHA DUFLOTH

**CARCINOMA DE MAMA HEREDITÁRIO EM MULHERES BRASILEIRAS:
MUTAÇÕES DOS GENES *BRCA1* E *BRCA2*, POLIMORFISMOS DOS
GENES DE REPARO DO DNA E CARACTERIZAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA
PELA TÉCNICA DE *TISSUE MICROARRAY***

Tese de Doutorado

**Orientador: Prof. Dr. LUIZ CARLOS ZEFERINO
Orientador Externo: Prof. Dr. FERNANDO CARLOS DE LANDÉR SCHMITT**

**UNICAMP
2004**

ROZANY MUCHA DUFLOTH

**CARCINOMA DE MAMA HEREDITÁRIO EM MULHERES BRASILEIRAS:
MUTAÇÕES DOS GENES *BRCA1* E *BRCA2*, POLIMORFISMOS DOS
GENES DE REPARO DO DNA E CARACTERIZAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA
PELA TÉCNICA DE *TISSUE MICROARRAY***

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Doutor em Tocoginecologia, área de Tocoginecologia

Orientador: Prof. Dr. LUIZ CARLOS ZEFERINO
Orientador Externo: Prof. Dr. FERNANDO CARLOS DE LANDÉR SCHMITT

UNICAMP
2004

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

D874c	Duflot, Rozany Mucha Carcinoma de mama hereditário em mulheres brasileiras:mutações dos genes de <i>BRCA1</i> e <i>BRCA2</i>, polimorfismos dos genes de reparo do DNA e caracterização imunoistoquímica pela técnica de Tissue Microarray / Rozany Mucha Duflot. Campinas, SP : [s.n.], 2004. Orientadores : Luiz Carlos Zeferino , Fernando Carlos de Landér Schmitt Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. 1. Doenças hereditárias. 2. Biologia molecular. 3. Prevalência. 4. Imunohistoquímica. I. Luiz Carlos Zeferino. II. Fernando Carlos de Landér Schmitt. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.
-------	--

BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO

Aluna: ROZANY MUCHA DUFLOTH

Orientador: Prof. Dr. LUIZ CARLOS ZEFERINO

Orientador Externo: Prof. Dr. FERNANDO CARLOS DE LANDÉR SCHMITT

Membros:

1.

2.

3.

4.

5.

**Curso de Pós-Graduação em Tocoginecologia da Faculdade
de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas**

Data: 02/12/2004

Com carinho, a meu filho Rodrigo.

Agradecimentos

Nossos agradecimentos aos orientadores.

Às mulheres que participaram deste estudo o nosso sincero reconhecimento

Sinceros agradecimentos a Irina Mattos, Sandra Costa, Sílvia Carvalho, Juliana Karina Heinrich, Rafael Queiroz pelo apoio e valiosa colaboração na realização deste estudo.

Ao Grupo de Patologia Mamária do Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto pelo apoio e estímulo.

Agradecemos a todos os amigos, docentes e funcionários do CAISM, Departamento de Anatomia Patológica, Biblioteca, Diretoria de Apoio Didático, Científico, Estatístico e Computacional, pela ajuda inestimável, fundamental para a realização deste trabalho.

“Um ser humano é parte de um todo que chamamos : “ o universo”, uma parte limitada no espaço e no tempo. Ele sente a si próprio, seus pensamentos e emoções, como algo separado do resto: um tipo de ilusão de ótica da consciência. Para nós, essa ilusão é apenas uma prisão, restringindo-nos a nossos desejos e afeições pessoais para com algumas pessoas mais próximas.

A nossa tarefa deve ser a de nos libertarmos dessa prisão, ampliando nosso círculo de compreensão e compaixão, de modo que possa incluir em sua beleza todas as criaturas viventes e a totalidade da natureza.”

Albert Einstein

Sumário

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS	xv
RESUMO	xvii
SUMMARY	xix
1. INTRODUÇÃO	21
1.1. FATORES DE RISCO E GENÉTICA DO CÂNCER DE MAMA	22
1.1.1. FATORES HORMONAIS	22
1.1.2. HISTÓRIA FAMILIAR.....	22
1.1.3. FATORES GENÉTICOS.....	23
1.1.4. SUSCEPTIBILIDADE GENÉTICA	24
1.2. SÍNDROME DO CÂNCER DE MAMA HEREDITÁRIO.....	27
1.2.1. CRITÉRIOS DE SELEÇÃO DE INDIVÍDUOS PARA PESQUISAS MOLECULARES..	28
1.2.2. ABORDAGEM DOS INDIVÍDUOS E FAMÍLIAS COM CÂNCER DE MAMA HEREDITÁRIO.....	30
1.2.3. DETECÇÃO DE MUTAÇÕES.....	31
1.2.4. ESTRUTURA GENÉTICA E ESPECTRO MUTACIONAL DOS GENES <i>BRCA1</i> E <i>BRCA2</i>	32
1.2.5. PREVALÊNCIA DE MUTAÇÕES NOS GENES <i>BRCA1</i> E <i>BRCA2</i> EM OUTRAS POPULAÇÕES	34
1.3. ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS DO CÂNCER DE MAMA.....	35
1.3.1. PERFIS DE EXPRESSÃO GÊNICA DO CÂNCER DE MAMA	38
1.3.2. MARCADORES DE CÉLULAS LUMINAIS E BASAIS	40
1.3.3. CITOQUERATINAS	40
1.3.4. PROTEÍNA P63	40
1.3.5. PROTEÍNA P-CADERINA	41
1.4. PROPOSTA E JUSTIFICATIVA DO ESTUDO	41
2. OBJETIVOS.....	43
2.1. OBJETIVO GERAL.....	43
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
3. PUBLICAÇÕES.....	45
3.1. ARTIGO 1	47
3.2. ARTIGO 2.....	65

3.3. ARTIGO 3.....	88
4. DISCUSSÃO.....	107
5. CONCLUSÕES	113
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	115
7. BIBLIOGRAFIA DE NORMATIZAÇÕES.....	125
8. ANEXOS	127
8.1. ANEXO 1	127
8.2. ANEXO 2	131

Símbolos, Siglas e Abreviaturas

ATP	Adenosina trifosfato
BRCA1	<i>Breast cancer 1 gene</i>
BRCA2	<i>Breast cancer 2 gene</i>
CAISM	Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher
CDIS	Carcinoma ductal <i>in situ</i>
CHEC2	<i>Checkpoint Kinase 2</i>
DNA	Ácido desoxirribonucléico
HER2	<i>Human epithelial receptor 2</i>
INCA	Instituto Nacional do Câncer
P53	Gene que codifica fosfoproteína de 53kDa
p53	Proteína do gene P53
p63	Proteína do gene P63
p-caderina	<i>Placental caderina</i>
RAD51	<i>Recombination Protein A, RECA</i>
RE	Receptor de estrógeno
Unicamp	Universidade Estadual de Campinas
Rad-51	Proteína de gene <i>RAD51</i>
XRCC3	<i>x-repair cross complementing gene</i>
XRCC1	<i>x-repair cross complementing gene</i>
XPD	<i>Xeroderma pigmentosum group D</i>

Resumo

OBJETIVOS: Identificar mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* em uma população brasileira com câncer de mama hereditário; analisar a frequência de polimorfismos nos genes *XRCC1*, *XPB*, *XRCC3* e *RAD51* em um grupo de pacientes brasileiras e sua associação com a susceptibilidade ao câncer de mama; analisar expressão das proteínas p63, CK5 e P-caderina em cânceres de mama familiar e esporádico. **MÉTODOS:** Este estudo teve componentes do tipo transversal e do tipo caso-controle. Foram constituídos quatro grupos: pacientes com câncer hereditário de mama; pacientes com câncer de mama esporádico; mulheres sem câncer de mama e com história familiar positiva de câncer de mama e/ou ovário; mulheres sem câncer de mama e sem história familiar de câncer de mama e/ou ovário. Foram coletados 10ml de sangue periférico para a realização de técnicas moleculares, nomeadamente *Single Strand Conformation Polymorphism* (SSCP) e Seqüenciação Direta. Espécimes de câncer de mama, conservados em blocos de parafina, foram selecionados no Laboratório de Patologia do Hospital das Clínicas/Unicamp, Brasil e no Laboratório de Patologia do Hospital São João/Universidade do Porto, Portugal, totalizando 168 casos. Dos blocos

doadores foram extraídos cilindros de 2mm de diâmetro e depositados nos blocos de parafina receptores, usando *Tissue Microarray* (Beecher Instruments, Silver Spring, Maryland). Nestes cortes foi feita a pesquisa dos marcadores de diferenciação do fenótipo basal/mioepitelial. **RESULTADOS:** Foram identificadas quatro mutações (13%), sendo uma mutação no gene *BRCA1* e três no gene *BRCA2*. No *BRCA1* foi encontrada uma mutação do tipo *frameshift*. Duas mutações do *BRCA2* são tipo nonsense e a outra do tipo *unclassified variant*. Não houve associação estatisticamente significativa entre os alelos e genótipos dos polimorfismos dos genes de reparo do DNA, *XRCC1*, *XPB*, *XRCC3* e *RAD51*. O câncer de mama familiar mostrou diferenças estatisticamente significantes do fenótipo imunoistoquímico dos marcadores de células basais/mioepiteliais (P-caderina, p63 and CK5), em relação aos cânceres esporádicos. **CONCLUSÃO:** Foram identificadas uma mutação no gene *BRCA1* e três mutações no gene *BRCA2* em mulheres com câncer de mama e história familiar de câncer de mama, o que correspondeu a uma frequência de 13% (4/31). Não foi observada associação da susceptibilidade ao câncer de mama com os polimorfismos dos genes *XRCC1*, *XPB*, *XRCC3* e *RAD51* em um grupo de pacientes brasileiras. Os marcadores p63, CK5 e P-caderina foram mais frequentemente expressos no câncer de mama familiar. A melhor caracterização do câncer familiar como entidade biológica distinta do câncer esporádico pode ser uma ferramenta útil para selecionar mulheres que deveriam submeter-se ao rastreamento de mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2*.

Summary

OBJECTIVE: To identify mutations in *BRCA1* and *BRCA2* genes in a Brazilian population of women with hereditary breast cancer; to analyze the frequency of polymorphism in genes *XRCC1*, *XPB*, *XRCC3* e *RAD51* in a group of Brazilian patients and its association with breast cancer susceptibility; to analyze the expression of p63, CK5 and P-cadherin proteins in familial and sporadic breast cancers. **METHODS:** This study was in part transversal and in part cross-sectional. The population evaluated in this study comprised four groups of women: patients with sporadic and familial breast cancers, women without breast cancer but with family history, women without breast cancer and without family history. The last group was the control group of this study. From each subject, 10ml of peripheral blood were collected to perform molecular analysis, namely Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) and Direct Sequencing. Paraffin blocks from breast cancer specimens were selected from the Pathology Laboratories from the Hospital das Clínicas/UNICAMP, Brazil and Hospital São João/Universidade do Porto, Portugal, totalising 168 cases. Cylinders with 2mm diameter were extracted from the donor blocks using the

Tissue Microarray technique (Beecher Instruments, Silver Spring, Maryland), and were sampled together to construct the receptor paraffin blocks. The analysis of mioepithelial differentiation/histogenesis was performed in these sections. Results analysis was carried out through the Chi-square test. **RESULTS:** Four mutations were identified: one in *BRCA1* and three in *BRCA2*. A frameshift *BRCA1* mutation, two nonsense *BRCA2* and one unclassified variant *BRCA2* mutation were identified. No statistically significant association between the alleles and genotypes DNA, *XRCC1*, *XPB*, *XRCC3* and *RAD51* polymorphism. Familial breast cancer was statistically different from sporadic cancer in regards of immunohistochemical phenotypes for basal/mioepithelial cell markers (P-cadherin, p63 and CK5). **CONCLUSIONS:** Thirteen percent of women with breast cancer and family history of breast cancer had at least one *BRCA1* gene mutation and three *BRCA2* gene mutations. We do not observe any statistical significance difference in the frequency of alleles and genotype of the genes *XRCC1*, *XRCC3*, *XPB* e *RAD51* in the group of patients studied. The markers, CK5 e P-cadherin was more frequently in familial breast cancers. The characterization of familial breast cancer as a biological entity distinct from sporadic cancer might be a useful tool to select women that should be screened to *BRCA1* and *BRCA2* genes mutation triaging.

1. Introdução

Foi estimado em 2003 que o câncer de mama representa a neoplasia mais freqüente entre as mulheres no mundo ocidental, com mais de um milhão de novos casos e cerca de 600.000 mortes anuais. As taxas de incidência são mais elevadas nos países industrializados como os Estados Unidos, Austrália e países da União Européia (GAHAFOOR et al., 2003) sendo a incidência na Ásia Oriental, 5 vezes menor do que nos países ocidentais (BASELGA e NORTON, 2002).

No Brasil, o câncer de mama apresenta alta incidência, sendo a neoplasia que mais causa mortes entre as mulheres. Dos 402.190 novos casos de câncer diagnosticados em 2003, o câncer de mama foi o segundo mais incidente entre a população feminina, sendo responsável por 41.610 novos casos e 9.335 óbitos, de acordo com estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA) (BRASIL, 2003).

A incidência crescente e a alta mortalidade do câncer de mama tornam indispensáveis os esforços no sentido de se identificarem elementos que possam aumentar a compreensão do comportamento biológico desta neoplasia e, por conseguinte, identificar pacientes com alto risco (BRASIL, 2003)

1.1. FATORES DE RISCO E GENÉTICA DO CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama é uma doença multifatorial e complexa em que existe uma forte relação entre fatores genéticos e não genéticos. A rigor, cabe destacar a ação hormonal e a história familiar como importantes fatores de risco implicados no desenvolvimento da neoplasia maligna da mama.

1.1.1. Fatores Hormonais

Menarca precoce, menopausa tardia e nuliparidade são fatores relacionados com ao risco de desenvolver câncer de mama (MARTIN e WEBER, 2000), sugerindo que a exposição prolongada ao estrógeno circulante contribui para o desenvolvimento da doença. Pensa-se que o principal efeito seja a estimulação da proliferação celular, o que leva ao aumento da probabilidade de uma célula tumoral se multiplicar (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2003). O mesmo acontece com o uso de anticoncepcionais, a obesidade na pós-menopausa e a ocorrência de uma gravidez a termo depois dos 30 anos (MARTIN e WEBER, 2000; MARCHBANKS et al., 2002; MITRA et al., 2004).

1.1.2. História familiar

Cerca de 10% dos casos de câncer de mama agrupam-se nas famílias, alguns são devido a mutações germinativas altamente penetrantes, dando origem a um elevado risco de câncer (NATHANSON et al., 2001).

As mulheres com um ou mais parentes de primeiro grau com câncer de mama têm risco duas a quatro vezes maior de desenvolverem a neoplasia

(PHAROAH et al., 1997). O risco aumenta à medida que aumenta o número de familiares afetados (COLDITZ et al., 1993), e observa-se a associação mesmo em parentesco de terceiro grau (SLATTERY et al., 1993). Mulheres com câncer de mama contralateral, desenvolvido até três anos do diagnóstico inicial, apresentam maior probabilidade de ter familiares com câncer (SLATTERY et al., 1993).

Ainda, mulheres jovens que apresentam câncer de mama, possivelmente apresentam um padrão genético de predisposição e essa hipótese é reforçada se essas mulheres vierem a apresentar doença bilateral, associação com outras neoplasias, incluindo ovário e cólon, bem como um heredograma sugestivo de padrão autossômico dominante (LYNCH et al., 1990; NAROD et al., 1991).

1.1.3. Fatores genéticos

O câncer de mama, como os cânceres em geral, é o resultado de mutações somáticas, neste caso, nas células epiteliais dos ductos da mama. Uma vez que as alterações genéticas estejam presentes, a célula pode proliferar e migrar, escapando dos controles do processo de morte celular programada (apoptose). Portanto, uma única célula neoplásica que tenha acumulado mutações germinativas (herdadas) e uma série de mutações somáticas (adquiridas) poderia, através de um processo seqüencial de progressão tumoral, sofrer transformação maligna e metastizar (DICKSON e LIPPMAN, 1995).

Embora, na gênese do câncer as alterações genéticas estejam sempre presentes, acredita-se que cerca de 5% a 10% dos casos de câncer de mama sejam hereditários, ou seja, identifica-se uma mutação no DNA germinal que, ao ser

transmitida a um indivíduo, confere-lhe, independentemente dos fatores que contribuem para o câncer esporádico da mama, um risco absoluto aumentado desta neoplasia. Este risco pode chegar a 80%, quando, na população geral o risco é de 8% a 10% (HOSKINS et al., 1995; HARBER e FEARON, 1998). Este risco elevado poderia ser explicado pela alta penetrância destas mutações.

1.1.4. Susceptibilidade genética

Há evidências recentes que a susceptibilidade para o desenvolvimento do câncer estaria relacionada a mutações e polimorfismos de alguns genes. Estudos sugerem que os genes envolvidos no reparo do DNA e manutenção da integridade do genoma estão implicados na proteção contra as mutações que conduzem ao câncer (BOHR, 1995; JIRICNY et al., 2000;). Evidências epidemiológicas mostram que a herança de variações genéticas de um ou mais loci, chamados genericamente de polimorfismos, podem resultar na redução da capacidade de reparo do DNA e no aumento do risco de câncer (HELZLSouer et al., 1996; STURGIS et al., 1999).

A predisposição genética a tumores é usualmente mediada pela herança da inativação de genes supressores de tumores. Neste contexto, e particularmente em famílias de alto risco, os mais importantes genes supressores de tumor associados com o câncer de mama são o *BRCA1* e *BRCA2*. Mulheres portadoras de mutações no *BRCA1* possuem até 80% de chance de desenvolver câncer de mama, e até 60% de desenvolver câncer de ovário em sua vida (EASTON et al., 1993). Entretanto se estas mulheres viverem até a idade de 70 anos, as suas

chances de desenvolver um segundo câncer de mama chega a 70% (ANDERSEN, 1996; PHAROAD et al., 1997). As mulheres que apresentam mutação no *BRCA2* possuem até 60% de chance de desenvolver um câncer de mama (ANDERSEN, 1996; PHAROAD et al., 1997; BRODY et al., 1998).

Os genes *BRCA1* e *BRCA 2* formam complexos com outras proteínas, tal como *RAD51*. Uma mutação *missense* no *RAD51* (Arg150Glu) foi descrita em pacientes japonesas com câncer de mama bilateral (KATO et al., 2000). Outros estudos sugeriram que *RAD51* (135 C/G) é um modificador clinicamente significativo, que aumenta o risco para câncer de mama no cenário do câncer de mama hereditário (LEVY-LAHAD et al., 2000).

Atualmente, estão sendo pesquisados polimorfismos em outros genes que podem estar relacionados a um aumento da susceptibilidade ao câncer de mama, como o *XRCC1*, *XPB*, *XRCC3* e *RAD51*.

XRCC3 (*x-ray repair cross complementing gene*) é um gene envolvido nas vias de reparo de quebra e de recombinação (LIU et al., 1998). A substituição do genótipo Thr241Met no gene *XRCC3* é uma mudança não conservativa, não residindo no domínio de ligação de ATP (adenosina trifosfato), que são os domínios funcionais que têm sido identificados nesta proteína. Este polimorfismo provavelmente desempenha algum papel na modificação do risco para desenvolver câncer de mama.

XRCC1 (*x-ray repair cross complementing gene*) é outro gene que tem papel na via de reparo da base de excisão e interage com outras proteínas, tal como DNA polimerase e DNA ligase III (CALDECOTT et al., 1996). O sistema de reparo de

base de excisão é ativado por radiação ionizante e por agentes alquilantes causando quebra na fita de DNA. O polimorfismo Arg399 reside no domínio C-terminal do *XRCC1* dentro de uma região relativamente não conservada entre domínio BRCT (depois do domínio C terminal da proteína de susceptibilidade ao câncer de mama). DUELL et al. (2002), mostraram em estudo caso-controle a associação positiva entre câncer de mama e *XRCC1* codon 399 genótipos Arg/Gln ou Gln/Gln, comparando com Arg/Arg entre afro-americanas, mas não em mulheres americanas brancas. Estes resultados sugerem que o gene *XRCC1* pode ter influência no risco de câncer de mama, talvez por modificar os efeitos da exposição ambiental.

XPB (xeroderma pigmentosum group B) é um gene que está envolvido na via de reparo da excisão de nucleotídeos na duplicação do DNA. Sua proteína repara uma grande variedade de lesões estruturalmente relacionadas, tal como *bulky adducts* e dímeros de timina (BRAITHWAITE et al., 1999). Um estudo mostrou que mulheres normais, que nunca fumaram e que apresentam formas variantes de *XPB751Gln*, possuem níveis mais elevados de DNA *adducts* que as mulheres com as formas variantes de *XPB551Lys* (MATULLO et al., 2001). Estudos têm evidenciado que DNA *adducts* são marcadores preditivos da carcinogênese (BRAITHWAITE et al., 1999; MATULLO et al., 2001; PALLI et al., 2001).

Ao lado destas descobertas recentes, cabe destacar a alteração do gene *CHEK2 (checkpoint kinase 2)* 1100delC que se associa a casos familiares de câncer de mama em sinergia com outros genes (MEIJERS-HEIJBOER et al., 2003). Além disso, esta alteração também confere risco de câncer de mama a mulheres

não selecionadas pela história familiar, tornando esta variante, quando presente, multiplicadora de risco de outros genes de susceptibilidade (*THE CHECK2 BREAST CANCER CASE-CONTROL CONSORTIUM*, 2004).

Ainda, apesar do risco da manifestação de um tumor em um indivíduo que herdou uma cópia do gene inativado ser maior que na população geral, este tumor pode ter a chance de se manifestar na dependência de outras alterações genéticas e da interação dos mecanismos poligênicos com os fatores ambientais (ANTONIOU et al., 2003).

1.2. SÍNDROME DO CÂNCER DE MAMA HEREDITÁRIO

As síndromes são definidas como combinações de sinais e sintomas formando apresentação clínica distinta indicativa de anormalidade particular. As síndromes de câncer hereditário são afecções genéticas nas quais as neoplasias malignas parecem aglomerar-se em certas famílias, cujas principais características clínicas estão apresentadas na Tabela 1. As primeiras descrições de uma síndrome de câncer hereditário remontam ao início do século XX, com a descrição por Warthin de uma família acometida por vários casos de neoplasias malignas no cólon, útero, estômago e outros órgãos que, posteriormente, passou a ser conhecida como Síndrome de Lynch (NIEDORF e SHANNON, 2001).

Os genes associados às síndromes de câncer hereditário tendem a pertencer mais freqüentemente ou ao grupo dos genes supressores de tumores que, quando alterados, não desempenham adequadamente seu papel regulador no crescimento

celular ou ao grupo de genes reparadores de erros no DNA. Raramente as síndromes estão relacionadas a oncogenes, associadas ao câncer quando inadequadamente ativadas.

Tabela 1. Características clínicas associadas ao câncer hereditário

Idade precoce ao diagnóstico
Múltiplas neoplasias em um mesmo indivíduo
Múltiplos membros de uma mesma família apresentando a mesma neoplasia ou neoplasias relacionadas
Múltiplas gerações acometidas

Modificado de: NIEDORF, 2001; SCHMITT, 2001

Cerca de 5% a 20% das mulheres com neoplasia de mama possuem história familiar e até um quarto herda anomalias cromossômicas autossômicas dominantes, principalmente mutações (ANDERSEN, 1996; LIDEREAU et al., 2000). Em 1990, HALL et al. (1990) evidenciaram mutações em células germinativas de um gene no *locus* 17q12-21, denominado *BRCA1*. Estudos posteriores mostraram associação com neoplasias de mama e ovário (EASTON, 1993). Um segundo *locus* foi identificado no braço longo do cromossoma 13q12 e denominado *BRCA2* (WOOSTER, 1994).

1.2.1. Critérios de seleção de indivíduos para pesquisas moleculares

As pacientes com mutações do *BRCA1* e *BRCA2* possuem características clínicas e familiares distintas. Essas características podem ser utilizadas para

selecionar os indivíduos que devem ser submetidos a testes moleculares para identificação das mutações destes genes. Sumariamente, na Tabela 2, estão os critérios utilizados para triagem das mulheres que estão sendo adotados pelo *European Collaborative Study* (BCLC), pelo *National Cancer Institute*, pelo *National Comprehensive Cancer Network* e pela *Sociedade Portuguesa de Senologia*.

Tabela 2. Critérios utilizados para inclusão de mulheres nos estudos genéticos e moleculares relacionados ao câncer de mama

<i>European Collaborative Study BCLC</i>	<i>National Cancer Institute</i>	<i>National Comprehensive Cancer Network</i>	<i>Sociedade Portuguesa de Senologia</i>
História pessoal			
Câncer de mama diagnosticado abaixo de 45 anos	Câncer de mama diagnosticado abaixo de 50 anos	Câncer de mama diagnosticado abaixo de 40 anos	Câncer de mama diagnosticado abaixo de 35 anos
Câncer de mama bilateral	Câncer de mama bilateral –História de cânceres de mama e ovário	Cânceres de mama e de ovário diagnosticados em uma paciente	Câncer de mama bilateral
História familiar			
Mais de três casos de câncer de mama e mais de um de ovário	História familiar de múltiplos casos de câncer de mama	Múltiplos tipos de câncer em uma mesma família: neoplasias de mama, tireóide, córtex da adrenal sarcomas linfomas e leucemias	Familiar com cânceres de mama e do ovário, um dos quais diagnosticado antes dos 60 anos, ou câncer de mama bilateral
Mais de dois familiares com câncer de mama	Cânceres de mama e de ovário na família		-Dois ou mais familiares do 1º grau com câncer de mama ou ovário, independente da idade de apresentação da neoplasia. -Dois familiares do 1º grau – um com câncer de ovário e outro com câncer de mama na pré-menopausa
Câncer de mama masculino	Um ou mais familiares com dois cânceres primários	Presença de um familiar com mutação em um dos genes de predisposição do câncer de mama	Homem com câncer de mama, independente da idade Qualquer familiar com mutação do BRCA

Extraído de: SCHMITT FC et al, 2001

1.2.2. Abordagem dos indivíduos e famílias com câncer de mama hereditário

O rastreamento de mutações dos genes *BRCA1* e *BRCA2* deve ser feito no contexto do aconselhamento genético. O primeiro passo consiste em elaborar um heredograma, que inclua familiares maternos e paternos, com os tipos de neoplasias, órgãos afetados e idade do diagnóstico.

Para aferir o risco individual de câncer de mama pode-se usar o método de Gail (BONDY et al., 1996), o qual considera os fatores ginecológicos, obstétricos e a história pessoal (biópsias de mama realizadas pela mulher) e familiar (mãe, filhas ou irmãs afetadas). Este método tem várias limitações quando utilizado em famílias com agregação familiar, pois não inclui familiares de 2º grau (como tias afetadas), não leva em conta a idade do diagnóstico de câncer de mama e também não permite incluir casos de outros cânceres (como por exemplo ovário).

Outra metodologia utilizada para a aferir o risco é o método de Claus (CLAUS et al., 1994) e leva em conta as famílias com agregação familiar. Neste, as idades em que os familiares de 1º e 2º graus (uma linhagem) foram afetados são usadas para estimar a probabilidade de que um componente hereditário esteja subjacente ao padrão familiar de neoplasias. Os gráficos obtidos com os cálculos de Claus podem também ser úteis para transmitir a informação do conceito de risco a estas mulheres. Este método pode, no entanto, subestimar a probabilidade dos componentes hereditários *BRCA1* e *BRCA2* nos casos de risco alto na família paterna, se a doente não tiver irmãs ou ainda se existir câncer de ovário em vez de câncer de mama nos familiares afetados.

O cálculo de probabilidade específica das mutações *BRCA1* e *BRCA2* pode também ser feito através de um programa de computador que utiliza estimativas epidemiológicas de frequências de mutações nos seus cálculos e considera, em um heredograma, os indivíduos afetados e os não afetados (PARMIGIANI et al, 1998). Ainda, há um modelo empírico publicado pela *Myriad Genetics Laboratories* que permite calcular de uma forma bastante simples o risco de mutações *BRCA1* e *BRCA2* em mulheres com câncer de mama antes dos 50 anos (FRANK et al., 1998).

1.2.3. Detecção de mutações

Existem vários métodos para a identificação de mutações. O método utilizado depende dos recursos do laboratório, assim como da existência de uma mutação conhecida na família e do grupo étnico ao qual pertence a paciente. A Tabela 3 resume os principais métodos de investigação das mutações, assim com as suas maiores limitações.

Tabela 3. Principais métodos de detecção de mutações nos genes

Método	Vantagens	Desvantagens
-Teste da proteína truncada (PTT)	-Grandes fragmentos de DNA -Muito seguro	-Trabalhoso -Não detecta mutações de sentido errôneo
-Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)	-Seguro e Simples	-Trabalhoso
-PCR alelo específico (AS)	-Seguro e Simples	- Detecta apenas mutações conhecidas
-Seqüenciamento	-Detecta e identifica a mutação	-Trabalhoso e caro

Extraído de: SCHMITT et al, 2001

1.2.4. Estrutura genética e espectro mutacional dos genes *BRCA1* e *BRCA2*

O *BRCA1* é um gene supressor tumoral localizado no cromossoma 17q21, composto de 5.500 pares de bases distribuídas em 22 exons e codifica uma proteína de 1863 aminoácidos. Este gene foi descrito em 1990 e clonado em 1994 (MIKI et al., 1994). O *BRCA2* é um gene supressor tumoral localizado no *locus* 13q12, foi clonado em 1995 e é composto por 11.000 pares de bases dispostas em 27 exons que codificam uma proteína de 3.418 aminoácidos (WOOSTER et al., 1995). Mutações podem ocorrer em toda a extensão destes genes e faz-se necessário um seqüenciamento completo para encontrar a região da ocorrência da mutação.

Entretanto, alguns grupos de pacientes possuem mutações fundadoras, que é a ocorrência com alta freqüência de uma ou mais mutações específicas em uma população, devido à provável origem comum da mutação. Os judeus Ashkenazi são um exemplo, pois mais de 90% de todas as mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* são as seguintes: 185delAG e 582insC no *BRCA1* e 6174delT no *BRCA2* (TONIN et al., 1996). Nestas populações específicas, devido à provável origem comum da mutação, o rastreamento pode ser mais direcionado, diminuindo os custos da pesquisa. Recente estudo identificou uma alteração no *BRCA1* exon 5 (Arg71Gly) em famílias com história de câncer de mama hereditário do Norte da Espanha, província de Galícia, por análise Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) (DUARTE et al, 2002). No entanto, a maioria das mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* tem distribuição geográfica distinta e está atualmente

sob investigação (HARBER e FEARON, 1998; SOARES et al., 1999; JARA et al., 2002; DURAN et al., 2003).

No Brasil o câncer de mama vem mostrando incidência e mortalidade ascendentes desde a década de 60, a qual representou um marco social no país. A industrialização iniciada nas duas décadas anteriores passou a expressar seu reflexo na população: houve redução da taxa de natalidade, as mulheres passaram a se inserir de forma mais atuante no mercado de trabalho, a primeira gestação passou a ocorrer mais tardiamente, a urbanização alterou os hábitos alimentares da população e a esperança de vida ao nascer aumentou. Todos estes fatores, em maior ou menor grau, parecem guardar alguma relação com o câncer de mama (KLIGERMAN, 1999). Neste cenário de envelhecimento populacional e maior exposição a fatores de risco se insere o câncer de mama no Brasil, responsável por cerca de 15% do total de cânceres no país (INCA, 2003). Considerando que 5% a 10% podem ter base hereditária (ANDERSEN, 1996; LIDEREAU et al., 2000), estima-se que no Brasil ocorram cerca de 2500 novos casos e 500 óbitos, por ano, de câncer de mama hereditário.

Importa salientar que os testes de detecção destas mutações são testes que foram desenvolvidos em outros países. Existem diferentes mutações descritas nos genes de susceptibilidade para o câncer de mama (*BRCA1* e *BRCA2*) e há técnicas para detectar estas mutações, mas, em cada região e em cada grupo étnico podem-se identificar mutações mais freqüentes, de modo que os testes são direcionados para a região do gene em que, naquela população, as mutações são mais freqüentes.

1.2.5. Prevalência de mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* em outras populações

Estima-se que a prevalência de mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* que predis põem ao câncer na população geral esteja entre 1/500 e 1/1000 indivíduos (SZABO e KING, 1997). De maneira geral, a Tabela 4 mostra a freqüência de mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* ocorrida em famílias de diferentes países.

Tabela 4. Freqüências de famílias e pacientes, em diferentes países, com mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2*

País	<i>BRCA1</i> (%)	<i>BRCA2</i> (%)
Famílias com três ou mais casos de câncer de mama (somente mulheres) e/ou câncer de ovário		
Grã-Bretanha	21	9
Canadá	40	16
Finlândia	-	8
França	24	18
Alemanha	18	-
Holanda e Bélgica	14	-
Hungria	22	-
Islândia	9*	64*
Israel	47	24
Itália	29	-
Japão	10*	-
Noruega	12	-
Rússia	79*	-
Suécia e Dinamarca	23	-
Estados Unidos	39	25
Famílias com homem e mulher com câncer de mama		
Estados Unidos	8	19
Hungria	0*	33*
Islândia	0*	90*
Indivíduos com cânceres de mama e ovário sem considerar a história familiar		
Islândia	-	8
Itália	8	-
Israel	9	6
Japão	4	2

Adaptado de: SZABO e KING, 1997.

1.3. ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS DO CÂNCER DE MAMA

Três linhas de pesquisa estão contribuindo para elucidar a biologia da glândula mamária e sua transformação maligna: análises fenotípicas de células epiteliais e lesões proliferativas mamárias; a identificação, purificação e caracterização de células progenitoras mamárias e *breast cancer-initiating cells* e estudos do perfil da expressão gênica através de tecnologia de *microarray*. Estas três abordagens estão provendo um fluxo de novas e coerentes informações que têm contribuído para aprimorar os modelos moleculares e celulares do epitélio da mama e seus carcinomas (BIRNBAUM et al., 2004).

A biologia e patologia da mama são atualmente embasadas em um conceito de dois tipos celulares que reconhece as células glandulares ou luminais e as células mioepiteliais (DEUGNIER et al., 2002). Os ductos e lóbulos são revestidos por uma camada luminal de células secretórias cuboidais. As células mioepiteliais estão em contato com a membrana basal e contêm proteínas de músculo liso (BIRNBAUM et al., 2004).

As duas camadas de células, juntamente com os fibroblastos que as rodeiam, formam a base dos ductos (LAKHANI e O'HARE, 2001; ALI e COMBES, 2002). Além destes tipos de células diferenciadas foram identificadas no epitélio de mama células pluripotentes, com capacidade de auto-regeneração e longo tempo de vida, e células progenitoras “committed” (BIRNBAUM et al., 2004) (Figura 1). Estas células localizam-se em um compartimento suprabasal, entre

o mioepitélio e a camada luminal, e poderão estar envolvidas na regeneração da glândula mamária após a fase de involução (DIRENZO et al., 2002).

Com base neste conhecimento, alguns modelos de diferenciação e proliferação da glândula mamária e da oncogênese mamária têm sido propostos. BOECKER e BUEGER (2003) propuseram um modelo de diferenciação celular, segundo o qual a partir de uma célula progenitora se diferencia o epitélio de mama. Esta célula, através de células intermediárias "*committed*", daria origem a duas vias de diferenciação, a mioepitelial e a luminal/glandular (Figura 2).

Histologicamente, a maior parte dos cânceres esporádicos da mama teria origem nas células epiteliais luminais, sendo este fato apoiado por evidências morfológicas bioquímicas e moleculares (ALI e COMBES, 2002; DIRENZO et al., 2002; CALLAGY et al., 2003). No entanto, estudos de expressão gênica obtidos através de *Microarrays* de cDNA distinguiram duas classes principais de tumores, uma com características de células basais e/ou mioepiteliais, e outra classe de células luminais (PEROU et al., 2000; DIRENZO et al., 2002; VAN'T VEER et al., 2002; SORLIE et al., 2003). Estes estudos indicaram que uma proporção de casos de câncer de mama apresentaria características basais/mioepiteliais, tendo como possível origem uma célula intermediária ao longo da via de diferenciação das células basais para células mioepiteliais. (BIRNBAUM et al., 2004).

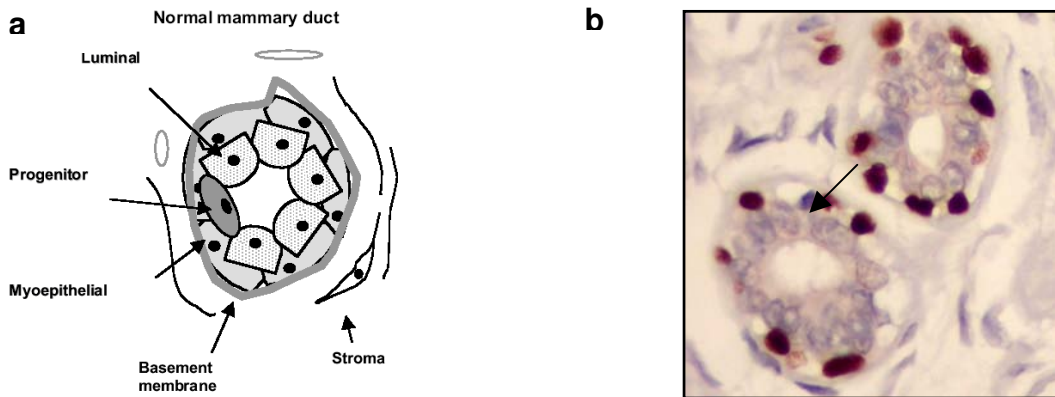


Figura 1: a) Células epiteliais da glândula mamária. Neste esquema está representado um corte de um ducto de mama normal, onde se observam as células luminais, as progenitoras e as mioepiteliais. A membrana basal separa as células mioepiteliais do estroma envolvente. b) Dúctulo de uma glândula mamária normal. A marcação imunoistoquímica para uma proteína basal (P63) identifica os núcleos das células basais/mioepiteliais. A seta indica as células luminais (ampliação 400X). (Adaptado de : BIRNBAUM et al., 2004).

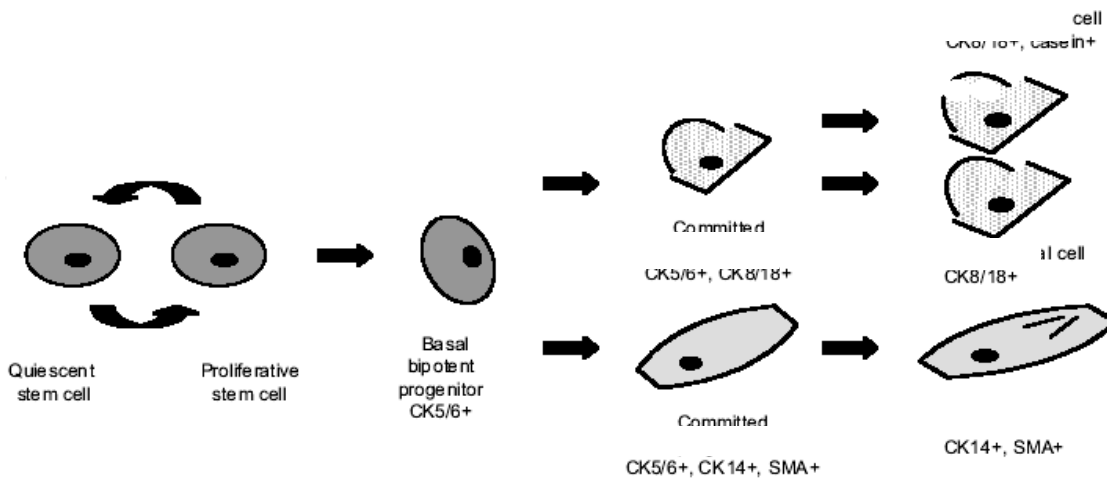


Figura 2: Células epiteliais da glândula mamária. Este esquema pretende representar a heterogeneidade, bem como a dinâmica na proliferação e diferenciação, do epitélio de mama. Células estaminais, pluripotentes com capacidade de auto-regeneração, após um estágio progenitor de diferenciação intermediária, originam duas linhas principais, a luminal/ glandular e a mioepitelial. (Adaptado de: BIRNBAUM et al., 2004).

1.3.1. Perfis de expressão gênica do câncer de mama

Um dos maiores desafios para o estudo e tratamento do câncer de mama é a resolução da heterogeneidade tumoral (CHUNG et al., 2002). A atual classificação do câncer de mama não é ainda perfeita; pacientes com o mesmo tipo de tumor e estágio podem ter diferentes respostas à terapêutica e diferentes prognósticos. As limitações do atual sistema devem-se à incapacidade de levar em consideração determinantes biológicos. Com o desenvolvimento da tecnologia de *Microarrays* de cDNA tornou-se possível efetuar uma procura sistemática de marcadores moleculares ao nível do genoma. Através da análise paralela de milhares de genes é possível definir fenótipos de diferentes tipos de tumor e talvez encontrar novos alvos terapêuticos (BASELGA e NORTON, 2002).

PEROU *et al.* (2000), utilizando uma plataforma de cerca de 8100 genes e cerca de 65 amostras, pertencentes a 42 pacientes, conseguiram definir perfis de expressão diferentes para os cânceres da mama. O primeiro nível de classificação separou tumores negativos para os receptores de estrógenos (RE) e tumores positivos para expressão deste receptor. A divisão subsequente sugeriu que os tumores RE negativos fossem subdivididos em grupos com expressão aumentada, ou não, do gene HER2. Distinguiram-se assim os fenótipos RE positivo, RE negativo/HER2 negativo e RE negativo/HER2 positivo, explicados a seguir.

O fenótipo RE negativo/HER2 positivo foi caracterizado pela expressão aumentada do gene HER2 e de um grupo específico de genes relacionados com o próprio receptor. Estes tumores apresentam uma reduzida expressão de RE e de genes a ele associados (Perou *et al.*, 2000). Muito recentemente BIRNBAUM

et al., (2004), através de ensaios de *Microarrays* de cDNA, sugeriram que sejam incluídos os tumores com expressão aumentada do gene *HER2* no subtipo basal.

O fenótipo RE positivo – fenótipo luminal foi caracterizado pela elevada expressão de genes expressos pelas células epiteliais luminais, como por exemplo as citoqueratinas 7, 8, 18 e 19. A este fenótipo está associada a assinatura de melhor prognóstico, não se verificando expressão aumentada de *HER2* (PEROU *et al.*, 2000). A maioria dos cânceres esporádicos é caracterizada por este perfil.

O fenótipo RE negativo/ *HER2* negativo (fenótipo basal) foi caracterizado pela positividade para as citoqueratinas basais 5, 14 e 17, o que pode ser indicativo de uma diferenciação basal para estes tumores de mama. Ao fenótipo basal foi também associada a expressão da P-caderina (PALACIOS *et al.*, 2004).

Em estudo semelhante utilizando *Microarrays* de cDNA, VAN'T VEER *et al.* (2002) mostraram que os cânceres associados a mutações no gene *BRCA1* apresentam diferenciação basal. Mais tarde, SORLIE *et al.*, (2003) confirmaram a existência deste fenótipo, ao qual está associado um pior prognóstico.

Os perfis genéticos do câncer de mama estão coerentes e norteiam os tratamentos individualizados para tumores positivos para RE (antiestrogênicos) e *HER2* (Trastuzumab). Terapias contra estes alvos não seriam efetivas nos tumores basais, uma vez que este subtipo tipicamente não expressa estas proteínas. Um dos recentes objetivos da investigação no câncer de mama é saber se cânceres basais surgem de uma célula basal, de forma a melhorar a terapia usando marcadores destas células como proteínas-alvo (SMALLEY e ASHWORTH, 2003).

1.3.2. Marcadores de células luminais e basais

As proteínas Ck5, p63 e P-cad são consistentemente expressas pelas células basais/mioepiteliais da mama (BOECKER et al., 2003; PALÁCIOS et al., 2003; REIS-FILHO et al., 2003; MAKEON 2004).

1.3.3. Citoqueratinas

As queratinas são proteínas dos filamentos intermediários e as suas diferentes isoformas são expressas durante o desenvolvimento e diferenciação do tecido epitelial. Nos tecidos epiteliais os filamentos intermediários são constituídos pela citoqueratina dos tipos I e II (REIS-FILHO et al., 2003). As citoqueratinas 5, 6 e 14, também conhecidas por citoqueratinas basais, são expressas pelas células progenitoras, enquanto que as citoqueratinas 8, 18 e 19 são expressas pelas células glandulares ou luminais (BOECKER et al., 2002; BOECKER e BUERGER, 2003).

1.3.4. Proteína p63

A proteína p63 é um fator de transcrição nuclear homólogo da p53, sendo necessária para o desenvolvimento da mama, como mostrado em estudos experimentais com ratos Knockout. O gene *TP63* decodifica pelo menos seis distintas isoformas, sendo que uma delas ($\Delta Np63$) é expressa na população celular basal do epitélio, sendo necessária para a manutenção da população somática basal (REIS-FILHO e SCHMITT, 2003).

Estudos imunoistoquímicos demonstraram a expressão da proteína P63 nos núcleos das células progenitoras/basais do epitélio adulto normal, sendo a isoforma predominante a ΔN -p63 α . A expressão desta proteína é perdida com a diferenciação das células progenitoras (MCKEON, 2004; WESTFALL e PIETENPOL, 2004).

1.3.5. Proteína P-caderina

P-cadherina é uma glicoproteína que, nos ductos de mamas e unidade ductulo-terminais, é expressa somente pelas células mioepiteliais e células basais (PERALTA et al., 1999; PAREDES et al., 2002). Alguns estudos têm mostrado associação da expressão da P-cadherina em cânceres da mama com um fenótipo embrionário mioepitelial e *stem cell-like* (HAN et al., 1999; GAMALLO et al., 2001; MADHAVAN et al., 2001).

1.4. PROPOSTA E JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

Considerando que as mutações dos genes *BRCA1* e *BRCA2* têm diferentes distribuições geográficas houve interesse em saber quais seriam as mutações mais freqüentes em mulheres brasileiras portadoras de câncer de mama hereditário. Espera-se que estes resultados contribuam para orientar eventuais programas de rastreamento destas mutações em populações brasileiras com maior suscetibilidade ao câncer de mama e outros relacionados.

Uma vez que a associação dos polimorfismos dos genes *XRCC1*, *XPB*, *XRCC3* e *RAD51* com o risco elevado para câncer de mama não é um

conhecimento consolidado, optou-se por avaliar esta associação em mulheres brasileiras com o intuito de colaborar com o conhecimento das alterações genéticas associadas à carcinogênese mamária.

O câncer hereditário é caracterizado por um conjunto de informações clínicas, sendo que a história familiar compõe este conjunto. O câncer esporádico da mama não apresenta características clínicas associadas à hereditariedade. Portanto, interessou saber se seria possível distinguir o câncer associado à história familiar do câncer esporádico, tendo como base os atuais conceitos de proliferação e diferenciação do epitélio mamário, fenótipo luminal e basal/mioepitelial, utilizando marcadores do fenótipo basal, que foram as proteínas p63, CK5 e p-cadherina. Espera-se que estas informações possam contribuir para selecionar mulheres com alta probabilidade de serem portadoras de alterações genéticas que confirmam alta susceptibilidade para o desenvolvimento do câncer de mama.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Contribuir para a caracterização dos aspectos genéticos do câncer de mama em mulheres brasileiras e contribuir para elucidar a possível histogênese dos cânceres de mama familiar e esporádico.

2.2. Objetivos específicos

- Identificar mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* em uma população brasileira com câncer de mama hereditário.
- Verificar se há associação da susceptibilidade ao câncer de mama com os polimorfismos dos genes *XRCC1*, *XPB*, *XRCC3* e *RAD51* em um grupo de pacientes brasileiras.
- Analisar a expressão das proteínas p63, CK5 e p-caderina em câncer de mama familiar e esporádico.

3. Publicações

Os resultados deste estudo estão sendo apresentados na forma de três artigos científicos, cada um deles relacionado a um objetivo específico.

Artigo 1

DUFLOTH, R.; CARVALHO, S.; HEINRICH, J.K.; SHINZATO, J.Y.; SANTOS, C.C.; ZEFERINO, L.C.; SCHMITT, F. – Analysis of *BRCA1* and *BRCA2* mutations in Brazilian breast cancer patients.

Este artigo foi aceito para publicação na revista *São Paulo Medical Journal*.

Artigo 2

DUFLOTH, R.; COSTA, S.; ZEFERINO, L.C and SCHMITT, F. - Dna repair gene polymorphism and susceptibility to familiar breast cancer in a group of patients from Campinas-Brazil

Este artigo está sendo submetido na revista *Carcinogenesis*, enviado em 18 de novembro de 2004.

Artigo 3

DUFLOTH, R.; MATOS, I.; ALVARENGA, M.; ZEFERINO, L.C.; SCHMITT, F. -
Tissue array technology: immunoportrait of a familial breast cancer series

Este artigo está em fase final de preparação, tendo como objetivo
submetê-lo à revista *Virchows Archives*.

3.1. Artigo 1

Analysis of *BRCA1* and *BRCA2* mutations in Brazilian breast cancer patients

(Análise de mutações nos Genes *BRCA1* e *BRCA2* em pacientes brasileiras com carcinoma de mama)

Rozany Mucha Dufloth, Sílvia Carvalho, Juliana Karina Heinrich, Júlia Yoriko Shinzato, César Cabello dos Santos, Luiz Carlos Zeferino, Fernando Schmitt

Protocol: RPM -1105/4 (September 8, 2004)

ORIGINAL ARTICLE

Rozany Mucha Dufloth, MD, MSc. Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM), School of Medical Sciences, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brasil. Institute of Pathology and Molecular Immunology, University of Porto, Portugal.

Sílvia Carvalho, BSc. Institute of Pathology and Molecular Immunology, University of Porto, Porto, Portugal.

Juliana Karina Heinrich, MSc. Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM), School of Medical Sciences, Universidade Estadual de Campinas, Campinas (UNICAMP), São Paulo, Brasil.

Júlia Yoriko Shinzato, PhD. Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM), School of Medical Sciences, Universidade Estadual de Campinas, Campinas (UNICAMP), São Paulo, Brasil.

César Cabello dos Santos, MD, PhD. Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM), School of Medical Sciences, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brasil.

Luiz Carlos Zeferino, MD, PhD. Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM), School of Medical Sciences, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brasil.

Fernando Schmitt, MD, PhD. Institute of Pathology and Molecular Immunology, School of Medicine, University of Porto, Porto, Portugal.

Place where the manuscript was produced: Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM), School of Medical Sciences, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil, and Institute of Pathology, University of Porto, Porto, Portugal

Address for correspondence:

Fernando Schmitt

Instituto de Patologia da Universidade de Porto

R. Roberto Frias, s/nº

4200 Porto – Portugal

Tel. (351 22) 557-0700

Fax: 351 22 557-0799

E-mail: fernando.schmitt@ipatimup.pt

Sources of funding: CAPES-Ministry of Education, Brazil, grant number BEX2448/02-5.

FAEP and the Fundo de Apoio ao Ensino e Pesquisa, UNICAMP, grants number 1294/02 and n.238/04

FLAD- Fundação Luso Americana para o Desenvolvimento, grant number L-V-172/2002.

Conflict of interest: None declared

ABSTRACT

CONTEXT: *BRCA1* and *BRCA2* are the two principal hereditary breast cancer susceptibility genes, and the prevalence of mutation of these genes in Brazilian women is unknown.

OBJECTIVE: To detect *BRCA1* and *BRCA2* mutations in Brazilian patients with breast cancer in an attempt to establish a genetic profile for this population.

TYPE OF STUDY: Transversal study.

SETTING: This study was carried out at the *Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brazil*, and at the *Institute of Pathology and Molecular Immunology of the University of Porto, Portugal*.

METHODS: Thirty-one breast cancer patients with positive family history according to criteria established by the Breast Cancer Linkage Consortium were studied and genomic DNA was extracted from peripheral blood. Single-strand conformation polymorphism was used for the analysis of exons 2, 3, 5 and 20 of the *BRCA1* gene and those cases showing PCR products with abnormal bands were sequenced. In addition, exon 11 of *BRCA1* and exons 10 and 11 of the *BRCA2* gene were directly sequenced in both directions.

RESULTS: We detected four mutations, one in the *BRCA1* and three in the *BRCA2* gene. The *BRCA1* mutation is a frameshift mutation located at codon 1756 of exon 20: 5382 insC. Two *BRCA2* mutations were nonsense mutations that were located at exon 11: S2219X and the other mutation was unclassified variant that was located at exon 11: C1290Y.

DISCUSSION: Apart from specific ethnic groups, there is no predominant mutation accounting for the majority of cases of inherited breast cancer. Since *BRCA1* and *BRCA2* mutations are widespread throughout the genes, the ideal method to seeking mutations is sequencing. This method has the advantage of detecting less frequent mutations. This study revealed that mutational screening restricted to previously report prevalent mutations could be not recommended in our population.

CONCLUSION: The prevalence of *BRCA1* or *BRCA2* mutation found in this study was for women with breast cancer and family history of breast cancer was 13% (4/31). Large studies are necessary to establish the significance of the *BRCA* mutations in the Brazilian Women and the penetration of specific mutation.

KEY WORDS: Breast cancer, hereditary disease, *BRCA1* gene, *BRCA2* gene, DNA sequence.

INTRODUCTION

Epidemiological studies have revealed several risk factors associated with an increased susceptibility to breast cancer. Among those, familial history is one of the most important. Five to 10 % of breast tumours are believed to be hereditary,^{1,2} and about 30% of young women who develop breast cancer are likely to show a genetic pattern of predisposition to the disease. This hypothesis is confirmed if these women go on to develop bilateral carcinomas associated with other neoplasias such as carcinoma of the ovary or colon, or if they show an autosomal dominant pattern of inheritance.^{3,4}

In this context, and particularly in high risk families, the most important tumour suppressor genes associated with breast cancer are *BRCA1* and *BRCA2*. Women who carry *BRCA1* mutations have about 80% probability of developing breast cancer, and 40 to 60% chance of developing ovarian cancer in their lifetime.⁵ Moreover, these women have a 65% probability of developing a second breast carcinoma if they reach the age of 70.⁶⁻⁸ Women who carry *BRCA2* mutations have a likelihood of developing breast cancer of about 85%.^{6,8,9}

BRCA1 is a tumour suppressor gene mapped to position q21 of chromosome 17. It is comprised of more than 80 kb, distributed in 22 exons, coding for a protein of 1863 aminoacids.^{10,11} Exon 11 comprises 60% of the gene, making it the main target for mutation detection. *BRCA2* is another tumour suppressor

gene mapping to locus 13q12, comprised of 10.4 kb, organised in 27 exons that code for a protein of 3418 amino acids.^{12,13}

Mutations in both *BRCA1* and *BRCA2* are spread throughout the entire gene. More than 600 mutations of *BRCA1* and 450 mutations of *BRCA2* have been described, according to the *Breast Cancer Information Core Website* (BIC).¹⁴

There are several methods for identifying *BRCA* mutations. The choice of the method depends on the resources available in the laboratory and of the existence of a previously identified mutation in the family or in the same ethnic group as the patient, albeit identification should always be confirmed by sequencing.

The aim of this study was to detect *BRCA1* and *BRCA2* mutations in a group of Brazilian patients with breast cancer in an attempt to establish a genetic profile for this population. This information would facilitate *BRCA1* and *BRCA2* mutational screening in the Brazilian population. Moreover, the detection of mutations in the patient's family allows the identification of high-risk individuals who are then able to seek genetic counselling.

MATERIALS AND METHODS

Informed Consent

Clinical information, pathology reports, slides, paraffin blocks and blood samples were obtained with the informed consent of patients under the guidelines and approval of the Ethical Research Committee of the School of Medical Sciences, UNICAMP, and the National Committee of Ethics in Research (CONEP).

Patient selection

Thirty women and one man with a diagnosis of carcinoma of the breast and a positive family history of breast cancer, who were receiving treatment at the Breast Cancer Outpatient Department of CAISM (Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher/UNICAMP, Brazil), were identified and invited to participate in this study. The criteria for the identification of individuals at high risk was based on the *Breast Cancer Linkage Consortium*¹⁵: early onset (less than 45 years of

age) and/or bilaterality; more than three cases of breast cancer and more than one case of ovarian cancer in the family; more than two first degree relatives involved, and male breast cancer.

DNA extraction and Mutation Detection

Genomic DNA was extracted from peripheral blood using the phenol: chloroform method following a standard protocol.¹⁶ We performed a molecular analysis of exons 2, 3, 5, 11 and 20 of the *BRCA1* gene and of exons 10 and 11 of the *BRCA2* gene. For this study we used single-strand conformation polymorphism and direct sequencing methods.

Single-strand conformation polymorphism (SSCP)

SSCP was used for the analysis of exons 2, 3, 5 and 20 of the *BRCA1* gene. The primers used for these exons are described in Table 1. Polymerase chain reaction (PCR) was carried out using 250 ng of DNA, 1 x PCR Buffer with 1.5 mM of MgCl₂ (Amersham Biosciences, Piscataway-NJ, U.S.A), 200 µM of each dNTP (Amersham Biosciences, Piscataway-NJ, U.S.A), 10 µmol of each primer, 1U of *Taq* DNA Polymerase (Amersham Biosciences, Piscataway-NJ, U.S.A) at a final volume of 25 µL. The PCR conditions were 96° C for five minutes, then 35 cycles of 30 seconds at 96° C, 30 seconds at the annealing temperature of the primer, 1 minute at 72° C followed by one cycle at 72° C for 10 minutes. For the SSCP analysis, the PCR reaction products were diluted in 1:1 loading buffer (95% formamide, 0.05% bromophenol blue, 0.05% xylene cyanol), and denatured at 98° C for 10 minutes. Electrophoresis of the denatured PCR products was carried out in nondenaturing 0.8X detection enhancement gels (BMA, Rockland, ME) at 170 W for 16 hours. In all the cases in which SSCP analysis showed an abnormal electrophoretic pattern, the sample was sequenced in both directions.

Direct Sequencing

PCR products with abnormal bands in the SSCP pattern were sequenced. In addition, in each patient sample, exon 10 of the *BRCA2* gene and 11 of both

BRCA genes were directly sequenced in both directions. Exon 11 of the *BRCA1* gene was divided into 12 overlapping fragments. Exon 10 of the *BRCA2* gene was divided into four overlapping fragments and exon 11 was divided into 16 overlapping fragments (primer sequences are described in Table 2). Sequencing was performed by the dideoxy chain termination method using Big Dye technology (Applied Biosystems, Foster City-CA, U.S.A). Sequencing primers were the same as those used for PCR. Cycling conditions were as follows: 96° C for five minutes, then 35 cycles of 30 seconds at 94° C, 30 seconds at 51° C, four minutes at 60° C, followed by one 10-minute cycle at 60° C. The products were purified using an MgCl₂/ethanol-based protocol and run on an ABI 3100 sequencer (AB Applied Biosystems, Foster City-CA, U.S.A). The results were analyzed using the 3100 Data Collection software. The sequencing was repeated twice for each sample to rule out the possibility of PCR fidelity artefacts and was carried out in both directions.

RESULTS

In four cases (13%) changes in the normal sequence of *BRCA1* and *BRCA2* genes were identified: one of these mutations occurred in the *BRCA1* gene and the other three in the *BRCA2* gene.

The alteration in exon 20 of *BRCA1* was found in a patient who developed breast cancer at the age of 33, and who has a first degree relative who also developed the disease. Furthermore, the anatomo-pathological profile of the carcinoma presented several characteristics usually associated with hereditary carcinoma, such as negativity for hormonal receptors, c-erbB2 expression and high histological grade. Migration alterations were found by SSCP and, after sequencing, a mutation was found in nucleotide 5382, codon 1756 of *BRCA1* exon 20. This mutation is referred to as 5382 ins C according to the BIC database. It is a *frameshift mutation* that originates in a premature stop codon (STOP 1829), leading to the formation of a truncated protein (Figure 1).

The *BRCA2* mutations were detected in two patients who developed the disease before the age of 45 and who have at least two second degree relatives with breast carcinoma. After sequencing, the mutation was localized in exon 11 of *BRCA*. This is a *nonsense* mutation originating from a stop codon in nucleotide 6885, referred to as S2219X according to the BIC database (Figure 2).

The other *BRCA2* mutation was also found in exon 11 of *BRCA2* in a patient who developed the disease at the early age of 29, and who had no relatives affected by breast cancer. The mutation is still an unclassified *variant* according to the BIC database and is referred to as C1290Y so it is impossible to affirm that it is not a pathogenic mutation (Figure 3).

DISCUSSION

The cloning of *BRCA 1*¹¹ and *BRCA 2*¹² genes, the major genes known to confer high risk for breast and ovarian cancer, has resulted in the characterization of a large number of mutations in both genes (Breast Cancer Information Core database). Apart from specific ethnic groups, there is no predominant mutation accounting for the majority of cases of inherited breast cancer. In some places, recurrent mutations have been described which facilitate the search for mutations in both genes. In spite of the high prevalence of breast cancer in the Brazilian population, there is no systematic study on *BRCA1* and *BRCA2* mutations in breast cancer patients with a family history of the disease.

In this study, we analyzed 31 breast cancer patients selected according to the criteria adopted by the Breast Cancer Linkage Consortium¹⁵ for hereditary breast cancer. We detected four mutations (13%), one in *BRCA1* and three in the *BRCA2* gene. The *BRCA1* mutation is a frameshift mutation located at codon 1756 of exon 20: 5382 ins C. This mutation has been previously described in Ashkenazi Jews and is clearly associated with an increased risk for breast cancer.¹⁷ The woman in the present study developed breast cancer at 33 years of age and she had a first degree relative with breast cancer. Considering

the prevalence of descendants of Ashkenazi Jews in the Brazilian population, it is not surprising to find this mutation in our group of patients.¹⁸

All three *BRCA2* mutations found in our study are novel mutations. There were two nonsense mutations located at exon 11: S2219X and one unclassified variant located at exon 11: C1290Y. The S2219X mutation was recently described in a Spanish population from Castilla-Leon.¹⁹ In that study, this mutation was considered a novel mutation in the Spanish population. As far as we know, this is the first time that this mutation has been described in the Brazilian population. Although the ancestry of these two patients was specifically investigated, neither of them was found to have Spanish ancestors. Both developed breast cancer before 45 years of age and both had two second-degree relatives with breast cancer.

The method used in this study, namely direct sequencing, is an expensive technique, but it is the best technique for detecting less frequent mutations and unclassified mutations, as we found in our study sample.

So, in addition to selecting the patients according to clinical-pathological criteria²⁰ we should also study specific populations in order to detect recurrent mutations which may allow us to establish a more cost-effective mutational analysis of this population.

In the present study, most of the mutations detected were novel mutations, indicating that mutational screening restricted to prevalent mutations that had been reported previously is not recommended in our population. The Brazilian population, just as the American population, is ethnically mixed, and founder mutations are therefore rare or even absent. Many European mutations have been observed in the United States and Canada, reflecting European migration to North America. Similarly, in many cases, Latin/South American families can trace their origins to the period of Spanish or Portuguese colonization. However, although a previous study in another South American country also demonstrated mutations related to the Ashkenazi Jews,²¹ previous studies carried out by our group in a Portuguese population²² and in a Spanish population from Galicia²³

failed to show the mutations that were detected in the present study in the Brazilian population. Further studies are necessary to establish the relevance of all of these alterations in our population.

This is the first study to investigate *BRCA1* and *BRCA2* mutations in Brazilian patients with breast cancer. The identification of *BRCA1* and *BRCA2* mutations is relevant for establishing preventive strategies in women with breast cancer and *BRCA* mutations in order to prevent contralateral breast tumors and ovarian tumors. In addition, the detection of mutations in the family of the patient allows identification of high-risk individuals who can then seek genetic counselling.

CONCLUSION

The prevalence of *BRCA1* or *BRCA2* mutation found in this study was for women with breast cancer and family history of breast cancer was 13% (4/31). Large studies are necessary to establish the significance of the *BRCA* mutation in the Brazilian Women and the penetration of specific mutation. Knowledge of the spectrum of mutations in their geographical distribution in Brazil is necessary to establish an effective detection strategy.

REFERENCES

1. Rahman N, Stratton MR. The genetics of breast cancer susceptibility. *Annu Rev Genet.* 1998;32:95-121.
2. Bertwistle D, Ashworth A. Functions of *BRCA1* and *BRCA2* genes. *Curr Opin Genet Dev.* 1998;8(1):14-20.
3. Narod SA, Feunteun J, Lynch HT, Lynch JF. Familial breast-ovarian cancer locus on chromosome 17q12-q23. *Lancet.* 1991;338(8759):82-3.
4. Lynch HT, Watson P, Conway TA, et al. Clinical/genetic features in hereditary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 1990;15(2):63-71.

5. Easton DF, 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(4):678-701.
6. Andersen TI. Genetic heterogeneity in breast cancer susceptibility. *Acta Oncol.* 1996;35(4):407-10.
7. Ellisen LW, Haber DA. Hereditary breast cancer. *Annu Rev Med.* 1998;49:425-36.
8. Pharoah PD, Day NE, Duffy S, Easton DF, Ponder BA. Family history and the risk of breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer.* 1997;71(5):800-9.
9. Brody LC, Biesecker BB. Breast cancer susceptibility genes, *BRCA1* and *BRCA2*. *Medicine.* 1998;77(3):208-26.
10. Hall JM, Lee MK, Newman B, et al. Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science.* 1990;250(4988):1684-9.
11. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene *BRCA1*. *Science.* 1994;266(5182):66-71.
12. Wooster R, Neuhausen SL, Mangion J, et al. Localization of a breast cancer susceptibility gene, *BRCA2*, to chromosome 13q12-13. *Science.* 1994;265(5181):2088-90.
13. Wooster R, Bignell G, Lancaster J, et al. Identification of the breast cancer susceptibility gene *BRCA2*. *Nature.* 1995;378 (6559):789-92.
14. Breast Cancer Information Core database. 2004 Acesso - 22/05/2004. Disponível na internet: <http://www.nhgri.nih.gov/Intramural_research/Lab_transfer/Bic/>.
15. Pathology of familial breast cancer: difference between breast cancers in carriers of *BRCA1* or *BRCA2* mutations and sporadic cases. Breast Cancer Linkage Consortium. *Lancet.* 1997;349(9064):1505-10.
16. Sambrook J, Fritsch ET, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.

17. Struwing JP, Hartge P, Wacholder S, et al. The risk of cancer associated with specific mutations of *BRCA1* and *BRCA2* among Ashkenazi Jews. *N Engl J Med*. 1997;336(20):1401-8.
18. Koifman S, Jorge Koifman R. Breast cancer mortality among Ashkenazi Jewish women in São Paulo and Porto Alegre, Brazil. *Breast Cancer Res*. 2001;3(4):270-5.
19. Duran M, Esteban-Cardenosa E, Velasco E, Infante M, Miner C. Mutational analysis of *BRCA2* in Spanish breast cancer patients from Castilha-Leon: identification of four novel truncating mutations. *Human Mutat*. 2003;21(4):448.
20. Schmitt FC, Reis Filho JS, Milanezi F, et al. Patología del cáncer de mama hereditario. *Rev Senología y Patol. Mam*. 2001;14(1):29-35.
21. Jara L, Ampuero S, Seccia L, et al. Frecuencia de la mutación 185delAG en el gen *BRCA1* en mujeres chilenas sanas con antecedentes familiares de câncer de mama [Frequency of the 185delAG mutation in the *BRCA1* gene in Chilean healthy women with family history of breast cancer]. *Rev Med Chil*. 2002;130(10):1113-23.
22. Soares R, Amendoeira I, Monteiro P, et al. *BRCA1* mutation analysis in a Portuguese population with early-onset breast and/or ovarian cancer. *Disease Markers*. 1999;15:93.
23. Duarte F, Cameselle-Teijeiro JF, Soares R, et al. Analysis of mutations in genes *BRCA 1* and *BRCA 2* among patients with breast and ovarian cancer in northern Portugal and Galicia [Análisis de mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2* en pacientes com câncer de mama y ovario del norte de Portugal y Galicia]. *Rev Clin Esp*. 2002;202(5):259-63.

RESUMO

CONTEXTO: *BRCA1* e *BRCA2* são os dois principais genes de susceptibilidade ao câncer de mama hereditário e a prevalência de mutações nestes genes não é conhecida em mulheres brasileiras.

OBJETIVO: Detectar mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2*, contribuindo para estabelecer um perfil dos carcinomas de mama hereditários na população Brasileira.

TIPO DE ESTUDO: Estudo transversal.

MÉTODOS: Trinta e um pacientes com carcinoma de mama e história familiar, de acordo com os critérios estabelecidos pelo *Breast Cancer Linkage Consortium*, foram estudados e tiveram DNA extraído do sangue periférico. *Single Strand Conformation Polymorphism* foi empregado para analisar os *exons* 2, 3, 5 e 20 do gene *BRCA1* e aqueles casos que mostraram produtos de PCR com bandas anormais foram seqüenciados. Entretanto, o *exon* 11 do gene *BRCA1* e *exons* 10 e 11 do gene *BRCA2* foram diretamente para o seqüenciamento.

RESULTADOS: Foram identificadas quatro mutações, sendo uma mutação no gene *BRCA1* e três no gene *BRCA2*. A mutação no gene *BRCA1* é do tipo *frameshift*, no *exon* 20: 5382 insC. Duas mutações encontradas no gene *BRCA2* são do tipo *nonsense* localizadas no *exon* 11: S2219X e uma do tipo *unclassified variant* localizada no *exon* 11: C1290Y.

DISCUSSÃO: Com exceção de grupos étnicos específicos, não há mutação predominante para a maioria dos cânceres de mama hereditários. Uma vez que as mutações dos genes *BRCA1* e *BRCA2* podem estar presentes em qualquer *exon* do gene, o método ideal para pesquisa-las é seqüenciamento, que tem como vantagem detectar mutações menos freqüentes. Este estudo revelou que o rastreamento mutacional baseado em informes prévios de prevalência de mutações poderia não ser recomendado em nossa população.

CONCLUSÃO: A prevalência de mutações dos genes *BRCA1* e *BRCA2* encontradas neste estudo para mulheres com câncer de mama e história familiar de

câncer de mama foi 13% (4/31). Estudos mais amplos são necessários para estabelecer a significância destas mutações na população brasileira.

PALAVRAS-CHAVE: Câncer de mama. Doença hereditária. Gene *BRCA1*. Gene *BRCA2*. Sequência do DNA.

Table 1. Primer list

BRCA 1				BRCA 2			
			AT*				AT*
Exon 2	F:	GAA GTT GTC ATT TTA TAA ACC TTT	57°C	Exon 10	1 F	GTG CTT CTG TTT TAT ACT TT	52°C
	R:	TGT CTT TTC TTC CCT AGT ATG T	57°C		R	CCA TTA GAT TCA AAT GTA G	52°C
Exon 3	F:	TCC TGA CAG AGC AGA CAT TTA	53°C	2	F	CTC ATT TGT ATC TGA AGT GG	56°C
	R:	TTG GAT TTT CGT TCT CAC TTA	53°C		R	GAG AGA TGA AGA GCA GCA TC	56°C
Exon 5	F:	CTC TTA AGG GCA GTT GTC AG	58°C	3	F	GCC ATT AAA TGA GGA AAC AG	56°C
	R:	TTC CTA CTG TGG TTG CTT CC	58°C		R	GAT AAT GGA AGC TGG CCA GC	56°C
Exon 20	F:	ATA TGA CGT GTC TGC TCC AC	57°C	4	F	CTG TTT GCT CAC AGA AGG AG	52°C
	R:	GGG AAT CCA AAT TAC ACA GC	57°C		R	GAT TCA GGT ACC TCT GTC	52°C
Exon 11	1 F:	CCA AGG TGT ATG AAG TAT GT	57°C	Exon 11	1 F	AGT GAA TGT GAT TGA TGG TAC	54°C
	R:	GAT CAG CAT TCA GAT CTA CC	57°C		R	CAT GCT GCA GCC AAG ACC TCT	54°C
	2 F:	CTC ACT AAA GAC AGA ATG	56°C	2	F	GAA GGA CAG TGT GAA AAT G	54°C
	R:	CTT TCT GAA TGC TGC TAT	56°C		R	CCT TTC TTG AAG GTG ATG C	54°C
	3 F:	CAG AAA CTG CCA TGC TTC AGA	56°C	3	F	AAG ATG TAT GTG CTT TAA ATG	54°C
	R:	AGG CTT GCC TTC TTC CGA TA	56°C		R	CTC CTC TGC AAG AAC ATA AAC	54°C
	4 F:	GTT CAC TCC AAA TCA GTA GAG AG	56°C	4	F	AGA CAC AGG TGA TAA ACA AG	54°C
	R:	CAG CTT TGC TTT TGA AGG CAG	56°C		R	CAA GGT ATT TAC AAT TTC AA	54°C
	5 F:	CCT AAC CCA ATA GAA TCA CTC G	56°C		5 F	GCT CTC TGA ACA TAA CAT TAA G	58°C
	R:	GAA CCA GGT GCA TTT GTT AAC TTC	56°C		R	CAT TAT GAC ATG AAG ATC AG	58°C
	6 F:	CAG CGA TAC TTT CCC AGA GC	56°C	6	F	TAT CTT AAA GAC CAC TTC TG	54°C
	R:	GTC CCT TGG GGT TTT CAA A	56°C		R	TGA AAC AAC AGA ATC ATG AC	54°C
	7 F:	CTG GAA GTT AGC ACT CTA GG	56°C	7	F	CTT CTG CAG AGG TAC ATC	54°C
	R:	GTT GCA CAT TCC TCT TCT GC	56°C		R	CAG TAA ATA GCA AGT CCg	54°C
	8 F:	CCG TTT TCA AAT CCA GGA AA	56°C	8	F	TTT GAT GGC AGT GAT TCA AG	54°C
	R:	TGA TGG GAA AAA GTG GTG GT	56°C		R	CTT ATG TCA GAA TGT AAT TC	54°C
	9 F:	GAG GCA ACG AAA CTG GAC TCA	56°C	9	F	ATC AGA AAC CAG AAG AAT TG	54°C
	R:	CTC AGG TTG CAA AAC CCC TA	56°C		R	ATC TCA ATG GTC TCA CAT GC	54°C
	10 F:	AAC AGA GGG CCA AAA TTG AA	56°C	10	F	CAG AGA GGC CTG TAA AGA C	54°C
	R:	GGG TGA AAG GGC TAG GAC TC	56°C		R	GAA GTC TGA CTC ACA GAA G	54°C
	11 F:	AAA GCG TCC AGA AAG GAG AGC	56°C	11	F	TGA AAA TTC AGC CTT AGC	54°C
	R:	GCC TTT GCC AAT ATT ACC TGG	56°C		R	GCA TCT TTT ACA TTG GAT	54°C
	12 F:	CAT TGA AGA ATA GCT TAA ATG	56°C	12	F	GTA TTG AGC CAG TAT TGA AG	54°C
	R:	CCT GGT TCC AAT ACC TAA GTT	56°C		R	TGC CTC GTA ACA ACC TGC CAT	54°C
				13	F	GTT TCA GTA AAG TAA TTA AG	54°C
					R	AGA TTT TCC ACT TGC TGT GC	54°C
				14	F	AAG TCA GTC TCA TCT GCA A	54°C
					R	GAA ACT TGC TTT CCA CTT G	54°C
				15	F	CAT CTG CTT TCT CTG GAT TTA	56°C
					R	ATG TTC TCA ACA AGT GAC ACT	56°C
				16	F	ATG TTG AAG GTG GTT CTT CAG	56°C
					R	GTG ATT GGC AAC ACG AAA GG	56°C

* AT: Annealing temperature

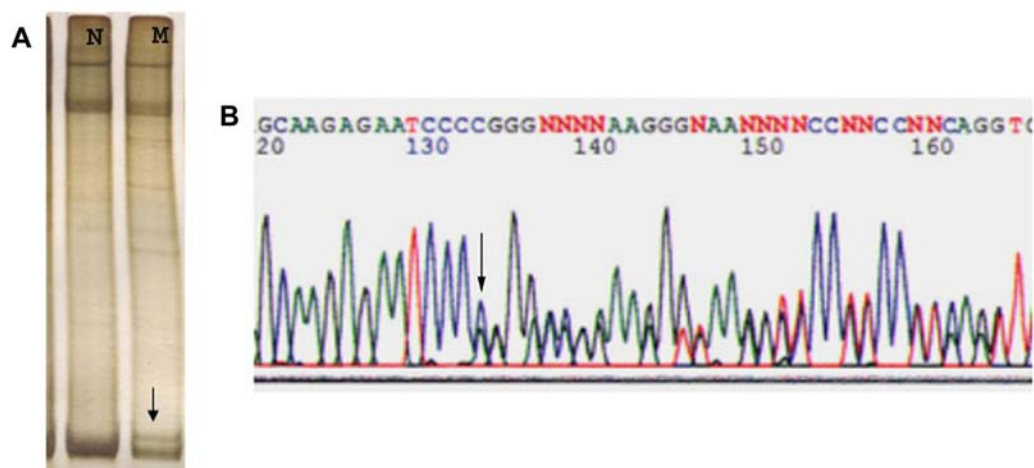


Figure 1. (a) SSCP pattern of exon 20 of the *BRCA1* gene of wild-type DNA sample (N) and mutated DNA (M) sample; (b) sequencing pattern of the sample with aberrant band in the SSCP gel. This corresponds to the 5382insC mutation.

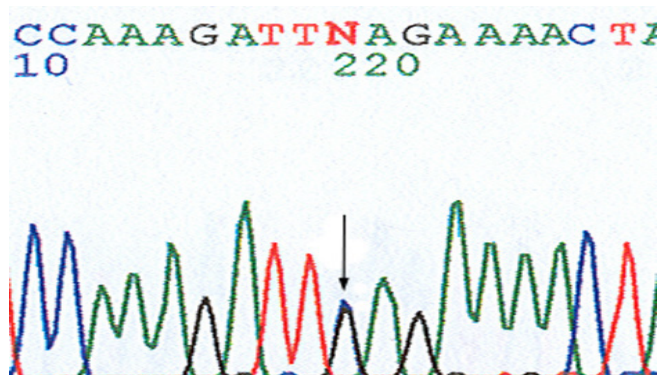


Figure 2. Sequencing pattern showing a nonsense mutation (change of a serine to a stop codon) in nucleotide 6884 of exon 11 of the *BRCA2* gene. This mutation is designated S2219X.

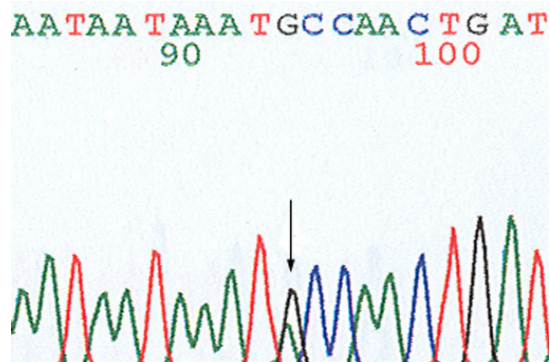


Figure 3. Sequencing pattern showing a mutation (change of a cysteine to a tyrosine) in nucleotide 4097 of exon 11 of the *BRCA2* gene. This mutation is still an unclassified variant.

3.2. Artigo 2

DNA REPAIR GENE POLYMORPHISMS AND SUSCEPTIBILITY TO FAMILIAR BREAST CANCER IN A GROUP OF PATIENTS FROM CAMPINAS, BRAZIL

Rozany Mucha Dufloth M.D., M.Sc ^{1,3} Sandra Costa MSc ⁵ Luiz Carlos Zeferino M.D.,Ph.D ^{1,2} and Fernando Schmitt M.D.,Ph.D ^{3,4}

1. Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil.
2. Department of Gynecology and Obstetrics, School of Medical Sciences, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil.
3. Institute of Pathology and Molecular Immunology, University of Porto, Portugal
4. School of Medicine, University of Porto, Porto, Portugal
5. Instituto de Ciências da Vida e da Saúde, Universidade do Minho, Braga, Portugal

Address for correspondence:

Luiz Carlos Zeferino, MD, PhD
Rua Shigeo Mori 1499
Campinas-SP
CEP: 13083-7675
BRAZIL
Tel -55-19-37889401
Fax: -55-19-37889302
e-mail: zeferino@caism.unicamp.br

Abstract

Several studies have reported that the genes involved in DNA repair and in the maintenance of genome integrity play a crucial role in protecting against the mutations that lead to cancer. Epidemiologic evidence has shown that inheritance of genetic variants at one or more loci results in a reduced DNA repair capacity and in an increased risk of cancer. Polymorphisms have been identified in several DNA repair genes, such as *XRCC1*, *XPB*, *XRCC3* and *RAD51*, but the influence of specific genetic variants on repair phenotype and cancer risk has not yet been clarified. This was a case-control study design with three cases group: 53 women with breast cancer and family history; 33 women with sporadic breast cancer; 175 women with no breast cancer but with family history. The control group included 120 women with no breast cancer and no family history. The PCR-RFLP method was used to analyze *XRCC1-Arg399Gln*, *XPB-Lys751Gln*, *XRCC3-Thr241Met* and *RAD51-G135C* polymorphisms. No statistically significant differences were found between the case groups and the control group for any of the polymorphisms analyzed, and also between the breast cancer and family history group and the sporadic breast cancer group. Sample sizes of women with breast cancer, whether familial or sporadic, are insufficient to show any small true differences between the groups, but we have to consider that currently there is no clearly consensus with respect to the association of these polymorphisms with breast cancer risk. Considering the data available, it can be conjectured that if there is any risk association between these nucleotide single-polymorphisms and breast cancer, this risk will probably be minimal. The greater the risk associated with cancer, the smaller the sample size required to demonstrate this association and the data between different studies are usually, therefore, more concordant.

key words: breast cancer, *XRCC1-Arg399Gln*, *XPB-Lys751Gln*, *XRCC3-Thr241Met* , *RAD51-G135C*, polymorphisms

Introduction

Many environmental factors, such as radiation, diet and the use of endogenous or exogenous estrogens, have been associated with the risk of developing breast cancer. Recently, it has been suggested that polymorphic differences may lead to differences in susceptibility to cancer development. Several studies have reported that the genes involved in DNA repair and in the maintenance of genome integrity play a crucial role in providing protection against the mutations that lead to cancer (1, 2). Epidemiologic evidence has shown that inheritance of genetic variants at one or more loci results in reduced DNA repair capacity and an increase in the risk of cancer (3, 4). Polymorphisms in several DNA repair genes have been identified, but the influence of specific genetic variants on phenotype repair and on the risk of developing cancer has not yet been clarified.

BRCA1 and BRCA2 are two well-known breast cancer-susceptible genes and their mutations account for most of the known hereditary carcinomas. BRCA proteins form complexes with other proteins involved in DNA repair such as Rad51. A missense mutation in Rad51 (Arg150Glu) has been described in Japanese patients with bilateral breast cancer (5). Further studies suggest that Rad51 (135 C/G) is a clinically significant modifier that raises breast cancer risk within the set of hereditary breast cancers (6).

XRCC3, XRCC1 and XPD belong to another group of genes that are involved in DNA repair and some polymorphisms in these genes are associated with increased of breast cancer risk (7). The Thr241Met genotype substitution in XRCC3 is a nonconservative change that does not reside in the ATP-binding domains, which are the only functional domains that have been identified in the protein. This polymorphism is therefore likely to play a role in modifying the risk of breast cancer.

The XRCC1 gene (x-ray repair cross complementing gene) plays a role in the base excision repair pathway, and presents a BRCA1 C-terminal domain (BRCT) characteristic of proteins involved in cycle checkpoint functions and DNA damage. The base excision repair system is activated by ionizing radiation and by alkylating agents that cause DNA base damage and strand breaks. The Arg399Gln polymorphism resides in the C-terminal domain of XRCC1 within a relatively non-conserved region between BRCT domains. These results suggest that this DNA repair gene, (XRCC1), codon 399 genotype, may influence breast cancer risk, perhaps by modifying the effects of different forms of environmental exposure.

The XPD gene is involved in the nucleotide-excision repair pathway. This protein repairs a wide range of structurally unrelated lesions, such as bulky adducts and thymidine dimers (9). It has been reported that normal individuals presenting the XPD 751Gln variant form a higher number of DNA adducts than XPD 751Lys polymorphism in never-smoking individuals (10). Therefore, it is likely, that these polymorphisms could also be involved in modifying susceptibility to carcinogenesis of the breast.

Breast cancer is the principal cause of death from cancer in women in Brazil as well as in most of the more developed countries. Furthermore, to our knowledge, the prevalence of these polymorphic DNA repair genes in our population has not yet been established. On the other hand, the possible association of these genotypic variants with breast cancer susceptibility has not yet been fully evaluated.

The aim of this study was to analyze the frequency of XRCC1-Arg399Gln, XPD-Lys751Gln, XRCC3-Thr241Met and RAD51-G135C in a sample of women in Campinas, Brazil, and to evaluate their association with breast cancer susceptibility, using a case-control study.

Material and methods

Patient selection

Women were enrolled to four groups, as follows: 53 women with breast cancer and family history of breast cancer; 33 women with sporadic breast carcinoma; 175 women with no breast cancer but with family history; and 120 women with no breast cancer and no family history. The last group served as the control group for this study. The women with breast cancer who were included in this study were receiving care at the Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM), UNICAMP, Brazil. The criteria for inviting the women with a family history of breast cancer to participate in the study were: early onset (less than 35 years of age); bilateral carcinoma; more than three cases of breast cancer and more than one case of ovarian cancer in the family; more than two first degree relatives involved, and male breast cancer. The women who did not have breast cancer were selected from volunteers among hospital personnel in the region of Campinas, and were classified according to family history of breast cancer. Those with more than three cases of breast cancer and more than one case of ovarian cancer in the family or who had one or more first degree relatives with breast cancer, or a case of male breast cancer in the family were considered to have a positive family history. The control group was made up of women who had no known cases of breast cancer in any first-degree or any-degree relative.

PCR-RFLP analysis

DNA was isolated from peripheral leukocytes obtained from women. Polymerase chain reaction (PCR) followed by enzymatic digestion (RFLP) was used for genotyping

the *XRCC1-Arg399Gln*, *XPB-Lys751Gln*, *XRCC3-Thr241Met* and *Rad51-G135C* polymorphisms. All the PCR reactions were carried out in a total reaction volume of 50 µl containing nearly 100 ng of genomic DNA, 1U Taq polymerase in 1x PCR buffer, 1.5mM MgCl₂, 0.2mM dNTPs and 0.20µM of each primer. Thermal cycling conditions were as follows: initial denaturation step at 95°C for 3 minutes, 35 cycles of PCR consisting of 95°C for 30s, 60°C, 55°C, 60°C and 53°C for 30s for XPB, XRCC1, XRCC3 and Rad51 genes, respectively, and 72°C for 30s, followed by a final extension step at 72°C for 10minutes.

The *XPB-Lys751Gln* polymorphism was determined using the following primers: sense, 5'-CTGCTCAGCCTGGAGCAGCTAGAATCAGAGGAGACGCTG-3'; anti-sense, 5'-AAGACCTTCTAGCACCAACCG-3', resulting in a 161bp PCR product. This was digested with PstI restriction enzyme. The digestion results present 41 and 120bp fragments corresponding to the *Gln751*allelic variant or a 161bp fragment presenting the *Lys751* allele.

The *XRCC1-Arg399Gln* polymorphism was determined using the following primers: sense, 5'-CAAGTACAGCCAGGTCCTAG-3'; antisense, 5'-CCTTCCCTCATCTGGAGTAC-3'. The 248bp PCR product was digested with NciI restriction enzyme: the *Arg399* allele was presented as fragments of 89 and 159 bp, and the *Gln399* allele (variant allele) was not digested.

The *XRCC3-Thr241Met* polymorphism was determined using the following primers: sense, 5'-GCCTGGTGGTCATCGACTC-3'; anti-sense, 5'-ACAGGGCTCTGGAAGGCACTGCTCAGCTCACGCACC-3', resulting in a 136bp PCR

product. This was digested with NcoI restriction enzyme: the *Thr241* allele was represented by 39 and 97bp fragments, and the *Met241* allele (variant allele) was not digested.

The *Rad51-G135C* polymorphism was determined using the following primers: sense, 5'-TGGGAACTGCAACTCATCTGG-3'; anti-sense, 5'-GCGCTCCTCTCTCCAGCA-3', resulting in a 157bp PCR product. This was digested with MvaI restriction enzyme. The digestion resulted in: 86 and 71bp fragments corresponding to the *G135* allele, or 161bp fragment presenting the *C135* allele (variant allele).

The PCR products were visualized using electrophoresis in a 2% agarose gel, and the digestion products were visualized using electrophoresis in a 3% agarose gel. PCR followed by enzymatic digestion was performed for the genotyping of the *XRCC1-Arg399Gln*, *Rad51-G135C*, *XPB-Lys751Gln*, *XRCC3-Thr241Met* polymorphisms.

Statistical Analysis

Chi-square analysis (χ^2 tests) was used to compare categorical variables. The level of significance was defined as 5%. The Odds ratio (OR) and its 95% confidence intervals (CI) were calculated to measure the strength of the association between polymorphism genotypes and breast carcinoma.

Results

No statistically significant differences were observed in the alleles or in the genotype frequencies of the *XRCC1-Arg399Gln*, *XPB-Lys751Gln*, *XRCC3-Thr241Met* and *RAD51-G135C* gene polymorphisms between the control group and the women with breast cancer and family history of breast cancer (Table 1), between the control group

and the women with sporadic breast cancer (Table 2), neither between the control group and the women with no breast cancer but with a family history of breast cancer (Table 3).

The women with sporadic breast cancer showed 45.5%, 48.5% and 6.1%, respectively, for *Thr/Thr*, *Thr/Met*, and *Met/Met* genotypes of the *XRCC3* gene, whereas the control group showed 57.6%, 29.7%, and 12.7% for the same genotypes. The *Thr/Met* genotype frequency came close to statistical significance with an OR of 2.07 and 95% CI of 0.85-5.06, considering the *Thr/Thr* genotype as reference (Table 3).

Because we were interested in the association between the genotype found in cases of sporadic cancer and the genotype identified in cases of women with a family history of breast cancer, these data were also analyzed; however, we found no statistically significant difference in the variant allele frequencies of these DNA repair genotypes. (Table 4).

Discussion

This study evaluated whether polymorphisms in four DNA repair genes involved in the base excision, nucleotide excision, and homologous double-stranded DNA repair pathways are related to the development of familial breast cancer. We found no association between familial breast cancer and the *XRCC1-Arg399Gln*, *XPB-Lys751Gln*, *XRCC3-Thr241Met* and *Rad51-G135C* polymorphisms in this study population.

Evidence suggests that the difference in DNA repair capacity among individuals is genetically determined. The phenotype of reduced repair capacity for one pathway is independent from the phenotype for any other pathway (11), which is consistent with the hypothesis that DNA repair is genetically regulated. Measurement of repair capacity in

twins (12) and the elevated frequency of individuals with reduced repair capacity among relatives of cancer patients is further evidence that repair capacity is a genetic trait (13, 14).

This variation in DNA repair capacity has characteristics that would be expected from cancer susceptibility genes since it may be the reduced function of the proteins encoded by these alleles rather than the absence of this function that causes disease. These proteins exist at polymorphic frequency in the general population, and they exhibit incomplete penetrance (15, 16).

The *XRCC1-Arg399Gln* gene polymorphism has been studied as a risk factor for various cancers. The variant *Gln* allele has been linked to an increased risk of lung cancer (17, 18), head and neck cancer (19) and possibly stomach cancer (20). On the other hand, this allele was reported to be associated with a reduced risk of bladder cancer (21), esophageal cancer (22) and non-melanoma skin cancer (23). Null association was also reported for lung cancer (23, 24). In relation to breast cancer, Duell et al., (25) reported a positive association between breast cancer and *XRCC1 codon 399 Arg/Gln* or *Gln/Gln* genotypes compared with *Arg/Arg* among African Americans but not in white American women. Shu et al (26) showed that the *XRCC1 Arg399Gln* gene polymorphism alone did not appear to play a substantial role in the risk of breast cancer among Chinese women. Smith et al (27) found no association between the *XRCC1 399 Gln/Gln* genotype and breast cancer. However, other studies showed an increased risk of breast cancer with this polymorphism (28, 29, 30).

The *XRCC3* gene is involved in the homologous recombinational pathway of the DNA double-strand-break repair and interacts directly with *RAD51* (31, 32). No association was found between this polymorphism and lung cancer (33, 34), squamous cell carcinoma of the head and neck (35, 36), gastric cancer (37) or basal cell carcinoma

(38). A positive association that achieved statistical significance was shown between the XRCC3 gene and melanoma and bladder cancer (39,40); however, these results were not confirmed in subsequent, larger studies (41, 42). In relation to *XRCC3-T241m*, Han et al (43) observed no significant elevation in the risk for breast cancer. There was some evidence of a combined effect of body mass index and this polymorphism on risk estimates and the researchers suggested that this polymorphism may influence breast cancer risk by modifying the effect of risk factors such as family history (44). Smith et al (27) provided evidence that a variant of the XRCC3 gene, particularly when found in combination with other variants, contributes to breast cancer susceptibility.

Our study on genotype *Thr/Met* of XRCC3 gene polymorphisms showed results close to statistical significance with an OR of 2.07 and 95% CI of 0.85-5.06, considering the *Thr/Thr* genotype as a reference. Interestingly, this result was observed in women with sporadic breast cancer but not in those with breast cancer and family history. The study group of women with sporadic breast cancer included 33 patients and this sample may be statistically underpowered to show true differences or to reject any difference between the groups compared.

XPB-L751G is the most commonly studied polymorphism of this gene and no statistically significant findings have ever been reported with respect to any increased risk of bladder cancer (45), skin basal cell cancer (46), non-small cell lung cancer (47) or melanoma (48). This polymorphism appears to be connected with smoking status and may increase cancer risk among non-smokers (49). In relation to breast cancer, among subjects with the *Gln/Gln* genotype at codon 751, adduct levels were higher in tumor tissue than in tissue from benign breast disease controls (50). Forsti et al (51) searched for low-penetrant genes by measuring the frequencies for single nucleotide

polymorphisms in the following genes: NBS1, XPC, XPD, XRCC1, XRCC3, MTHFR, and cyclin D1. They concluded that none of the polymorphisms tested were associated with breast cancer, with the probable exception of XPD. In fact, there is little data on the association between breast cancer risk and XPD polymorphism.

The product of the RAD51 gene works in conjunction with BRCA1 and BRCA2 in the repair of double-stranded DNA breaks. Jakubowska et al (52) suggested that RAD51 may be a genetic modifier of the breast cancer risk in BRCA1 carriers in the Polish population. Kadouri et al (53) showed that in non-carrier breast cancer cases, carrying RAD51-G135C was not associated with breast cancer risk, but they suggested that the risk may be significantly elevated in carriers of BRCA2 mutations who also carry a *RAD51-135C* allele. In BRCA1 carriers and non-carriers, no effect of this single-nucleotide polymorphism was found. Blasiak et al (54) suggested that the *G/C* polymorphism of the RAD51 gene may not be directly involved in the development and/or progression of breast cancer; therefore, it may not be useful as an independent marker of this disease.

The functional significance of the single-nucleotide polymorphism of the DNA-repair gene in DNA repair and human breast cancer risk is currently the subject of intense study, and there are many challenges that must be met. The results available should be interpreted with caution and other more conclusive studies should be carried out. The discrepancies between the results currently available could be due to different subject sample sizes and different study designs. Diverse environmental exposure could also contribute towards divergent results.

The results of this study do not provide insights into the function of these polymorphisms at a cellular level, but they do indicate that these DNA-repair gene

polymorphisms are not significantly associated with familial breast cancer in the study population. The sample sizes of the groups of women with breast cancer, women with familial breast cancer and women with sporadic breast cancer are not sufficiently large to detect any true differences between the groups, but we have to consider that currently there is no clearly consensus with respect to the association of these polymorphisms with breast cancer risk. Considering the data available, it can be conjectured that if there is any risk association between these nucleotide single-polymorphisms and breast cancer, this risk will probably be minimal. The greater the risk associated with cancer, the smaller the sample size required to demonstrate this association and the data between different studies are usually, therefore, more concordant.

Acknowledgments: The authors wish to thank the staffs of the involved institutions and all of the participants and volunteers for their contribution. Financial support was received from CAPES-Ministry of Education, Brazil, grant number BEX2448/02-5 and FLAD- Luso-Brazilian Development Foundation, grant number L-V-172/2002.

References

1. Jiricny, J. and Nystrom-Lahti, M. (2000) Mismatch repair defects in cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **10**, 157-161.
2. Bohr, V.A. (1995) DNA repair fine structure and its relations to genomic instability. *Carcinogenesis*, **16**, 2885-2892.
3. Helzlsouer, K.J., Harris, E.L., Parshad, R. et al. (1996) DNA repair proficiency: potential susceptibility factor for breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, **88**, 754-755.
4. Sturgis, E.M., Castilho, E.J., Li, L. et al. (1999) Polymorphisms of DNA repair gene XRCC1 in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Carcinogenesis*, **20**:2125-2129.
5. Kato, M., Yano, K., Matsuo, F. et al. (2000) Identification of Rad51 alteration in patients with bilateral breast cancer. *J. Hum. Genet.*, **45**, 133-7.
6. Levy-Lahad, E., Lahad, A., Eisenberg, S. et al. (2001) A single nucleotide polymorphism in the RAD51 gene modifies cancer risk in BRCA2 but not BRCA1 carriers. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **98**, 3232-3236.
7. Liu, N., Lamerdin, J.E., Tebbs, R.S. et al. (1998) XRCC2 and XRCC3, new human Rad51-family members, promote chromosome stability and protect against DNA cross-links and other damages. *Mol. Cell.*, **1**, 783-793.
8. Caldecott, K.W., Aoufouchi, S., Johnson, P. et al. (1996) XRCC1 polypeptide interacts with DNA polymerase beta and possibly poly (ADP-ribose) polymerase, and DNA ligase III is a novel molecular 'nick-sensor' in vitro. *Nucleic Acids Res.*, **24**, 4387-4394, 1996.

9. Braithwaite, E., Wu, X., Wang, Z. (1999) Repair of DNA lesions: mechanisms and relative repair efficiencies. *Mutat. Res.*, **424**, 207-219.
10. Matullo, G., Palli, D., Peluso, M. et al. (2001) XRCC1, XRCC3, XPD gene polymorphisms, smoking and (32) P-DNA adducts in a sample of healthy subjects. *Carcinogenesis*, **22**, 1437-1445.
11. Chu G., Mayne L. (1996) Xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy: do the genes explain the disease? *Trends Genet.*, **12**, 187-192.
12. Pero, R., Byrnelsson C., Byrnelsson T. A. et al. (1983) A genetic component of the variance of N-acetyl-2-actylaminofluorene-induced DNA damage in mononuclear leukocytes determined by a twin study. *Hum. Genet.*, **65**, 181-184.
13. Kovacs, E., Almendral, A. (1987) Reduced repair synthesis in healthy women having first degree relatives with breast cancer. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, **51**, 1051-1057.
14. Pero, R., Johnson, D., Markowitz, M. et al. (1989) DNA repair synthesis in individuals with and without a family history of cancer. *Carcinogenesis*, **10**, 693-697.
15. Mohrenweiser, H., Jones. I. (1998) Variation in DNA repair is a factor in cancer susceptibility: a paradigm for the promises and perils of individual and population risk estimation?. *Mutat. Res.*, **400**, 14-23.
16. Shen, R., Jones, I., Mohrenweiser, H. (1998) Nonconservative amino acid substitution variants exist at polymorphic frequency in DNA repair genes in healthy humans. *Cancer Res.*, **58**, 604-608.
17. Divine, K.K., Gilliland, F.D., Crowell, R.E. et al. (2001) The XRCC1399 glutamine allele is a risk factor for adenocarcinoma of lung. *Mut. Res.*, **461**, 273-278.

18. Zhou, W., Liu, G., Miller, D.P., Thurston, S.W. et al. (2003) Polymorphism in the DNA repair genes XRCC1 and ERCC2, smoking, lung cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.*, **12**, 359-365.
19. Surgis, E.M., Castilho, E.J., Li, L., Zheng, R. et al. (1999) Polymorphisms of DNA repair gene XRCC1 in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Carcinogenesis*, **20**, 2125-2129.
20. Shen H, Xu Y, Quian Y. ET AL. (2000) Polymorphisms of the DNA repair gene XRCC1 and risk of gastric cancer in Chinese population. *Int. J. Cancer*, **88**, 601-606.
21. Stern, M.C., Umbach, D.M., van Gils, C.H. et al. (2001) DNA repair gene XRCC1 polymorphisms, smoking, and bladder cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.*, **10**, 125-131.
22. Lee, S.G., Kim, B., Choi, J. et al. (2002) Genetic polymorphisms of XRCC1 and risk of gastric cancer. *Cancer Lett.*, **187**, 53-60.
23. Nelson, H.H., Kesley, K.T., Mott, L.A. et al. (2002) The XRCC1Arg399Gln polymorphism, sunburn, and non-melanoma skin cancer: evidence of gene-environment interaction. *Cancer Res.*, **62**, 152-155.
24. Cavalieri, E., Frenkel, K., Liehr, J.G. et al. (2000) Estrogens as endogenous genotoxic agents: DNA adducts and mutations *J. Natl. Cancer Inst. Monog.*, **27**, 75-93.
25. Duell, E.J., Holly, E.A., Bracci, P.M. et al. (2002) A population-based study of the Arg399Gln polymorphism in X-ray repair cross complementing group 1 (XRCC1) and risk of pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res.*, **62**, 4630-6.
26. Shu, X.O., Cai, Q., Gao, Y.T. et al. (2003) A population-based case-control study of the Arg399Gln polymorphism in DNA repair gene XRCC1 and risk of breast cancer *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.*, **12**, 1462-1467.

27. Smith, T.R., Miller, M.S., Lohman, K. (2003) Polymorphisms of XRCC1 and XRCC3 genes and susceptibility to breast cancer *Cancer Letters* **190**, 183-190.
28. Sigurdson, A.J., Hauptmann, M., Chatterjee, N. et al. (2004) Kin-cohort estimates for familial breast cancer risk in relation to variants in DNA base excision repair, BRCA1 interacting and growth factor genes. *B.M.C. Cancer*, **12**, 9-12.
29. [Figueiredo, J.C., Knight, J.A., Briollais, L.](#) et al. (2004) Polymorphisms XRCC1-R399Q and XRCC3-T241M and the risk of breast cancer at the Ontario site of the Breast Cancer Family Registry. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.*, **13**, 583-91.
30. Han, J., Hankinson, S.E., Zhang, S.M. et al. (2004) Interaction between genetic variations in DNA repair genes and plasma folate on breast cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.*, **13**, 520-4.
31. Liu, N., Lamerdin, J.E., Tebbs, R.S. et al. (1998) XRCC2 and XRCC3, new human Rad51_family members, promote chromosome stability and protect against DNA cross-links and other damages. *Mol. Cell.*, **1**, 783-793.
32. Johnson, R.D. and Jasin, M.(2001) Double- strand-break-induced homologous recombination in mammalian cells. *Biochem. Soc. Trans.*, **29**, 196-201.
33. Xing, D.Y., Tan, W., Song, N. et al. (2001) Ser326Cys polymorphism in hOGGI gene and risk of esophageal cancer in Chinese population. *Int. J. Cancer*, **95**,140-143.
34. Sugimura, H., Kohno, T., Wakai, K. et al. (1999) hOGGI Ser326Cys polymorphism and lung cancer susceptibility. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.*, **8**, 669-674.
35. Wikman, H., Risch, A., Klimek, F. et al. (2000) OGGI polymorphism and loss of heterogosity (LOH): significance for lung cancer susceptibility in Caucasian population. *Int. J. Cancer*, **88**, 932-937.

36. Benhamou, S., Tuimala, J., Bouchardy, C. et al. (2004) DNA repair gene XRCC2 and XRCC3 polymorphisms and susceptibility to cancers of the upper aerodigestive tract. *Int. J. Cancer*, **112**,901-4.
37. Shen, H., Wang, X., Hu, Z. et al. (2004) Polymorphisms of DNA repair gene XRCC3 Thr241Met and risk of gastric cancer in a Chinese population. *Cancer Lett.*, **206**, 51-8.
38. Jacobsen, N.R., Nexø, B.A., Olsen, A. et al. (2003) No association between the DNA repair gene XRCC3 T241met polymorphism and risk of skin cancer and breast cancer. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.*, **12**, 584-585.
39. Matullo, G., Guarrera, S., Caturán, S. et al. (2001) DNA repair gene polymorphism, bulky DNA adducts in white blood cells and bladder cancer in case-control study. *Int. J. Cancer*, **92**, 562-567.
40. Winsey, S.L., Haddad, N.A., Marsh, H.P. et al. (2000) DNA repair gene XRCC3 is associated with the development of skin cancer. *Cancer Res.*, **60**, 5612-5616.
41. Duan, Z., Shen, H., Lee, J.E. et al. (2002) DNA repair gene XRCC3 241Met variant is not associated with risk of cutaneous malignant melanoma. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.*, **11**, 1142-1143.
42. Stern, M.C., Umbach, D.M., Lunn, R.M. et al. (2002) DNA repair gene XRCC3 polymorphism, its interaction with smoking and XRCC1 polymorphisms and bladder cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.*, **11**, 939-943.
43. Han, J., Hankinson, S.E., Ranu, H. et al. (2003) Polymorphisms in DNA double-strand break repair genes and breast cancer risk in the Nurses' Health Study. *Carcinogenesis*, **25**, 189-195.

44. Figueiredo, J.C., Knight, J.A., Briollais, L. et al. (2004) H. Polymorphisms XRCC1-R399Q and XRCC3-T241M and the risk of breast cancer at the Ontario site of the Breast Cancer Family Registry. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.*, **13**, 583-91.
45. Mattulo, G., Guarrera, S., Carturan, S. et al. (2001) DNA repair gene polymorphism, bulky DNA adducts in white blood cells bladder cancer case-control study. *Int. J. Cancer*, **92**, 562-567.
46. Vogel, U., Hedayati, M., Dybdahl, M. et al. (2001) Polymorphisms of DNA repair gene XPD: correlation with risk of basal cell carcinoma revisited. *Carcinogenesis*, **22**, 899-904.
47. Butkiewicz, D., Rusian, M., Enewold, L. (2001) Genetic polymorphism in DNA repair genes and risk of lung cancer. *Carcinogenesis*, **22**, 593-597.
48. Winsey SL, Halder NA, March HP, Bunce M, Marshall SE, Harris AL et al. (2000) A variant within the DNA repair gene XRCC3 is associated with the development of melanoma skin cancer. *Cancer Res.*, **60**, 5612-5616.
49. Zhou, W., Liu, G., Miller, D.P. et al. (2002) Gene-environment interaction for the ERCC2 polymorphisms and cumulative cigarette smoking exposure in lung cancer. *Cancer Res.*, **62**, 1377-1381.
50. Tang, D., Cho, S., Rundle, A. et al. (2002) Polymorphisms in the DNA repair enzyme XPD are associated with increased levels of PAH-DNA adducts in a case-control study of breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.*, **75**, 159-66.
51. Forsti, A., Angelini, S., Festa, F. et al. (2004) Single nucleotide polymorphisms in breast cancer. *Oncol. Rep.*, **11**, 917-22.

52. Jakubowska, A., Narod, S.A., Goldgar, D.E. et al. (2003) Breast cancer risk reduction associated with the RAD51 polymorphism among carriers of the BRCA1 5382insC mutation in Poland. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.*, **12**, 457-9.
53. Kadouri, L., Kote-Jarai, Z., Hubert, A. et al. (2004) A single-nucleotide polymorphism the RAD51 gene modifies breast cancer risk in BRCA2 carriers, but not in BRCA1 carriers or noncarriers. *Br. J. Cancer*, **90**, 2002-2005.
54. Blasiak, J., Przybyłowska, K., Czechowska, A. et al. (2003) Analysis of the G/C polymorphism in the 5'-untranslated region of the RAD51 gene in breast cancer. *Acta Biochim. Pol.*, **50**, 249-53.

Table 1 – Frequency of XRCC1Arg399Gln, XPDlys751Gln, RAD51-G135C and XRCC3Thr241Met polymorphism in a group of women without breast cancer but familial history and controls individuals

Polymorphism	Cases (%)	Controls(%)	p	OR (CI95%)
XRCC1Arg399Gln				
Allele				
Gln	119 (34.0)	70 (29.4)	0.242	1.24 (0.85-1.79)
Arg	231 (66.0)	168 (70.6)		
Genotype				
Arg/Arg	79 (45.1)	59 (49.6)	reference	
Arg/Gln	73 (41.7)	50 (42.0)	0.731	1.09 (0.65-1.84)
Gln/Gln	23 (13.1)	10 (8.4)	0.190	1.72 (0.71-4.21)
XPDlys751Gln				
Allele				
Gln	105 (29.7)	70 (29.9)	0.948	0.99 (0.68-1.44)
Lys	249 (70.3)	164 (70.1)		
Genotype				
Lys/Lys	93 (52.5)	58 (49.6)	reference	
Lys/Gln	63 (35.6)	48 (41.0)	0.431	0.82 (0.48-1.39)
Gln/Gln	21 (11.9)	11 (9.4)	0.669	1.19 (0.50-2.86)
RAD51-G135C				
Allele				
C	26 (7.7)	19 (8.0)	0.898	0.96 (0.50-1.86)
G	312 (92.3)	219 (92.0)		
Genotype				
GG	144 (85.2)	103 (86.6)	reference	
GC	24 (14.2)	13 (10.9)	0.449	1.32 (0.61-2.89)
CC	1 (0.6)	3 (2.5)	0.204	0.24 (0.01-2.61)
XRCC3Thr241Met				
Allele				
Met	115 (33.0)	65 (27.5)	0.158	1.30 (0.89-1.90)
Thr	233 (67.0)	171 (72.5)		
Genotype				
Thr/Thr	88 (50.6)	68 (57.6)	reference	
Thr/Met	57 (32.8)	35 (29.7)	0.392	1.26 (0.72-2.21)
Met/Met	29 (16.7)	15 (12.7)	0.259	1.49 (0.70-2.19)

Table 2 – Frequency of XRCC1Arg399Gln, XPDLys751Gln, RAD51-G135C and XRCC3Thr241Met polymorphism in a group of women with breast cancer and family history of breast cancer and controls individuals.

Polymorphism	Cases (%)	Controls (%)	p value	OR (CI95%)
XRCC1Arg399Gln				
Allele				
Gln	31 (29.2)	70 (29.4)	0.975	0.99 (0.58-1.69)
Arg	75 (70.8)	168 (70.6)		
Genotype				
Arg/Arg	26 (49.1)	59 (49.6)	reference	
Arg/Gln	23 (43.3)	50 (42.0)	0.900	1.04 (0.50-2.17)
Gln/Gln	4 (7.5)	10 (8.4)	0.576	0.91 (0.22-3.57)
XPDLys751Gln				
Allele				
Gln	30 (28.3)	70 (29.9)	0.762	0.92 (0.54-1.58)
Lys	76 (71.7)	164 (70.1)		
Genotype				
Lys/Lys	30 (56.5)	58 (49.6)	reference	
Lys/Gln	16 (30.2)	48 (41.0)	0.228	0.64 (0.30-1.40)
Gln/Gln	7 (13.2)	11 (9.4)	0.697	1.23 (0.38-3.90)
RAD51-G135C				
Allele				
C	6 (6.3)	19 (8.0)	0.586	0.77 (0.26-2.12)
G	90 (93.7)	219 (92.0)		
Genotype				
GG	42 (87.5)	103 (86.6)	reference	
GC	6 (12.5)	13 (10.9)	0.814	1.13 (0.36-3.48)
CC	0 (0.0)	3 (2.5)	-	
XRCC3Thr241Met				
Allele				
Met	32 (30.8)	65 (27.5)	0.544	1.17 (0.68-2.00)
Thr	72 (69.2)	171 (72.5)		
Genotype				
Thr/Thr	27 (51.9)	68 (57.6)	reference	
Thr/Met	18 (34.6)	35 (29.7)	0.482	1.30 (0.59-2.84)
Met/Met	7 (13.5)	15 (12.7)	0.752	1.18 (0.38-3.3)

Table 3 – Frequency of XRCC1Arg399Gln, XPDLys751Gln, RAD51-G135C and XRCC3Thr241Met polymorphism in a group of women with sporadic breast carcinoma and controls individuals

Polimorphism	Cases (%)	Controls (%)	p value	OR (CI95%)
XRCC1Arg399Gln				
Allele				
Gln	16 (24.2)	70 (29.4)	0.409	0.77 (0.39-1.50)
Arg	50 (75.8)	168 (70.6)		
Genotype				
Arg/Arg	20 (60.6)	59 (49.6)	reference	
Arg/Gln	10 (30.3)	50 (42.0)	0.219	0.59 (0.23-1.48)
Gln/Gln	3 (9.1)	10 (8.4)	0.584	0.89 (0.17-4.03)
XPDLys751Gln				
Allele				
Gln	24 (36.4)	70 (29.9)	0.318	1.34 (0.22-2.47)
Lys	42 (63.6)	164 (70.1)		
Genotype				
Lys/Lys	13 (39.4)	58 (49.6)	reference	
Lys/Gln	16 (48.5)	48 (41.0)	0.345	1.49 (0.60-3.68)
Gln/Gln	4 (12.1)	11 (9.4)	0.337	1.62 (0.37-6.83)
RAD51-G135C				
Allele				
C	5 (8.3)	19 (8.0)	0.552	1.05 (0.33-3.15)
G	55 (91.7)	219 (92.0)		
Genotype				
GG	26 (86.7)	103 (86.6)	reference	
GC	3 (10.0)	13 (10.9)	0.598	0.91 (0.19-3.82)
CC	1 (3.3)	3 (2.5)	0.601	-
XRCC3Thr241Met				
Allele				
Met	20 (30.3)	65 (27.5)	0.659	1.14 (0.60-2.16)
Thr	46 (69.7)	171 (72.5)		
Genotype				
Thr/Thr	15 (45.5)	68 (57.6)	reference	
Thr/Met	16 (48.5)	35 (29.7)	0.076	2.07 (0.85-5.06)
Met/Met	2 (6.1)	15 (12.7)	0.412	0.60 (0.09-3.25)

Table 4 – Statistical analysis of XRCC1Arg399Gln, XPDlys751Gln, RAD51-G135C and XRCC3Thr241Met polymorphism in a women with sporadic breast carcinoma and women with breast cancer and family history of breast cancer.

Polymorphism	Sporadic breast carcinoma	Familial breast carcinoma	p value	OR (CI95%)
XRCC1Arg399Gln				
Allele				
Gln	16 (24.2)	31 (29.2)	0.474	0.77 (0.36-1.65)
Arg	50 (75.8)	75 (70.8)		
Genotype				
Arg/Arg	20 (60.6)	26 (49.1)	reference	
Arg/Gln	10 (30.3)	23 (43.3)	0.194	0.54 (0.19-1.51)
Gln/Gln	3 (9.1)	4 (7.5)	0.647	1.01 (0.16-6.27)
XPDlys751Gln				
Allele				
Gln	24 (36.4)	30 (28.3)	0.739	1.11 (0.56-2.20)
Lys	42 (63.6)	76 (71.7)		
Genotype				
Lys/Lys	13 (39.4)	30 (56.5)	reference	
Lys/Gln	16 (48.5)	16 (30.2)	0.089	2.24 (0.79-6.43)
Gln/Gln	4 (12.1)	7 (13.2)	0.529	1.19 (0.25-5.55)
RAD51-G135C				
Allele				
C	5 (8.3)	6 (6.3)	0.423	1.36 (0.34-5.37)
G	55 (91.7)	90 (93.7)		
Genotype				
GG	26 (86.7)	42 (87.5)	reference	
GC	3 (10.0)	6 (12.5)	0.462	0.71 (0.13-3.45)
CC	1 (3.3)	0 (0.0)	0.386	-
XRCC3Thr241Met				
Allele				
Met	20 (30.3)	32 (30.8)	0.716	0.88 (0.42-1.84)
Thr	46 (69.7)	72 (69.2)		
Genotype				
Thr/Thr	15 (45.5)	27 (51.9)	reference	
Thr/Met	16 (48.5)	18 (34.6)	0.331	1.57 (0.57-4.35)
Met/Met	2 (6.1)	7 (13.5)	0.306	0.47 (0.06-2.90)

3.3. Artigo 3

Tissue array technology: immunoportrait of a familial breast cancer series

Rozany Mucha Dufloth, Irina Matos, Marcelo Alvarenga, Luiz Carlos Zeferino and Fernando Schmitt

ORIGINAL ARTICLE

Rozany Mucha Dufloth, MD, MSc. Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM), Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil. Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto, Portugal.

Irina Matos, BSc. Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto, Portugal

Marcelo Alvarenga, MD, PhD Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM), Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brasil.

Luiz Carlos Zeferino, MD, PhD. Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM), Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brasil.

Fernando Schmitt, MD, PhD. Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto, Faculdade de Medicina da Universidade de Porto, Porto, Portugal.

Place where the manuscript was produced: Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM), Faculdade de Ciências Médicas da Universidade

Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brasil, and Instituto de Patologia da Universidade de Porto, Porto, Portugal

Address for correspondence:

Fernando Schmitt

Instituto de Patologia da Universidade de Porto

R. Roberto Frias, s/nº

4200 Porto – Portugal

Tel. (351 22) 557-0700

Fax: 351 22 557-0799

E-mail: fernando.schmitt@ipatimup.pt

Sources of fundings:

CAPES-Ministério da Educação-Brasil, nº BEX2448/02-5.

FAEP – Fundo de Apoio ao Ensino e Pesquisa da UNICAMP, n. 1294/02 e n.238/04

FLAD- Fundação Luso Americana para o Desenvolvimento, ref L-V-172/2002

Summary

Introduction: Breast carcinomas represent a heterogeneous group of tumors, with a diverse biologic behavior, outcome and response to therapy. The current pathological classification is suboptimal since patients with identical tumor types and stage of the disease can have markedly contrasting outcomes. The limitations of the current system stem from its inability to take into account biological determinants of prognosis. The advent of Microarray Technology with high-throughput and parallel analysis of thousands of genes is allowing the linking of expression profiles to clinical outcome and response to therapy.

Objective: To analyze the expression of the basal/mioepithelial markers (P63, Ck5 and P-Cadherin) in a familial and sporadic breast carcinomas by Tissue Microarrays.

Methods: The population evaluated in this cross-sectional study comprised two groups of women: patients with sporadic and familial breast cancers, distributed according to the criteria defined by the *Breast Cancer Linkage Consortium*. Paraffin stored breast cancer specimens were selected from the pathology laboratories from the Hospital das Clínicas/UNICAMP, Brazil and Hospital São João/Universidade do Porto, Portugal, totaling 168 cases. Using the *Tissue Microarrayer* technique (Beecher Instruments, Silver Spring, Maryland), cylinders with 2mm diameter were extracted from the donor blocks, and sampled together to construct the receptor paraffin blocks. The analysis of mioepithelial markers was performed in these sections. Results analysis was carried out through the Chi-square test.

Results: Familial breast carcinomas showed specific differences from sporadic tumours: high Grade (II and III); more frequently ER and HER2 negative, had a high proliferation rate and frequently expressed and co-expressed basal molecular markers (P-Cadherin, P63 and CK5). This study thus reveals distinct morphological and immunohistochemical features in familial and sporadic breast tumors.

Conclusion: The present study revealed distinct immunoportraits for familial and inherited cancers, the later presenting with prominent basal/mioepithelial phenotype. In addition, this study points out to the utility of the Tissue Microarrays technique in evaluating phenotipical factors of familial breast cancer, therefore helping the surgical pathologist to select patients for mutation analysis.

Key words: Breast; Myoeptlelial cell; Tissue microarrays; Familial breast carcinomas

INTRODUCTION

The breast cancer is a heterogeneous disease characterized by different histopathological subtypes. PEROU et al (2000) (1) by gene expression profiling studies suggested a classification of human breast cancers into distinct subtypes estrogen receptor ER positive (luminal subtype) and ER negative/HER2 negative (basal subtype) and ER negative/HER2 positive. Sorlie et al (2003) (2) advanced in the characterization of gene expression pattern measured by DNA microarray. They stated that luminal and basal tumors subtypes are distinct biological entities, and that there are strong evidences for the universality of the distinction between basal-like and luminal-like subtypes comprising different patients population and perhaps different genetic predisposition to breast cancer.

Histopathological studies have revealed those BRCA1 and BRCA2 tumors are cytological heterogeneous with a greater degree of cellular pleomorphism, and less tubule formation as compared with non-BRCA tumors (LAHKANI et al, 1997(3), LAKHANI et al, 1998) (4). Van't Veer (2002) showed that women carrying BRCA1-mutated alleles all had tumors with the basal-like gene expression pattern. The basal epithelial cells of the normal mammary gland were characterized by expression of cytokeratins 5 and 6 (JORGE S. REIS FILHO et al, 2003). (6). Böcker et al (2002) (7) designed a new cell biology concept that there is a CK5

positive progenitor cells that could differentiate to CK5 negative glandular cells, from which most of the breast cancer arises. Other possible pathway from these progenitor cells is the differentiation to myoepithelial cells. Carcinomas with a pure stem cell phenotype and malignancies of myoepithelial type are rare (Lakhany O'Hare 2001) (8).

Considering that women carrying BRCA mutation had tumors with the basal-like gene expression pattern and considering that familial breast carcinoma arising in women who lack germ-line mutations in BRCA1 and BRCA2 genes differs from sporadic breast cancer (LAKLANI, 2004)(9), we hypothesized that the familial breast carcinoma could be characterized by subtype tumor that follows the pathway in the tumorigenesis, toward myoepithelial/basal cells from the progenitor cells. The basal-like cells express consistently the protein p63, p-cadherin and CK5 (JORGE S. REIS FILHO et al, 2003(6); BOECKER W AND BUERGER H, 2003 (10); PALACIOS et al, 2003(11); MCKEON F2004 (12)). In order to better understand the myoepithelial and basal cell histogenesis of familial and sporadic breast cancer, we assessed the immunohistochemical expression of these three proteins.

The characterization of immunohistochemical features of these groups of tumors could help selecting those women who should undergo to genetic testing more effectively and also to gain insight into the histogenesis and differentiation of the breast tumors. Here we reported the immunohistochemical differences in a series of familial and sporadic breast cancer groups by means of tissue microarrays.

METHODS

Patients selection

Fifty women with breast carcinoma and positive familial history who were assisted at the Ambulatório de Oncologia Mamaria do CAISM (Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher/UNICAMP, Brasil) were invited to participate in this

study. The criteria for identification women at high risk was based at the Breast Cancer Linkage Consortium (6): early onset (less than 45 years-old) and/or bilaterally; more than three cases of breast cancer and more than one case of ovarian cancer in the family; more than two first degree relatives involved and male breast cancer. One hundred eighteen paraffin embedded blocks of breast cancer specimens were recruited from the Hospital São João. These women were aged 18-70 years and had no first-degree or another degree relatives with breast cancer.

TMA construction

Representative areas of the different lesions were carefully selected on H&E-stained sections and marked on individual paraffin blocks. Two tissue cores (2-mm diameter) were obtained from each specimen. In each TMA block non-neoplastic breast tissue samples were included as controls. The tissue cores were precisely arrayed into a new paraffin block using a TMA workstation (TMA builder ab1802, abcam®, Cambridge, UK). Eleven TMA blocks consisting of 24 2mm-diameter cores were constructed. An H&E-stained section was reviewed to confirm the presence of morphological representative areas of the original lesions.

Immunohistochemistry

Immunohistochemical staining was performed by streptavidin-biotin-peroxidase technique (LabVision Corporation, Fremont CA, USA). For antigen retrieval 2µm TMA sections were incubated with an antigen unmasking solution (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA) pH 6.0, at 98° C for 20 (P-cad and Ck5) or 30 (ER, Her2 and P63) minutes. Antibodies, dilutions, and suppliers are listed in Table 1.

After cooling at RT, the sections were rinsed with PBS, which was further used for all the washing steps. Endogenous peroxidase activity was blocked by incubation of the slides in a 3% hydrogen peroxide solution in methanol (Merck, Germany). Unspecific binding sites were blocked by the use of a blocking solution (UltraVisionBlock, LabVision, Fremont, CA, USA). Immunostaining was

performed overnight at 4° C (P-cad and Ck5) or during one hour at RT (Her2, ER, and P63). After rinsing the slides, they were incubated for 15 minutes with a biotinylated secondary antibody followed by enzyme-labelled streptavidin also for 15 minutes (both from UltraVisionBlock, LabVision, Fremont, CA, USA). The antigen-antibody reaction was developed using the DAB hydrogen peroxide reaction (UltraVisionBlock, LabVision, Fremont, CA, and USA), which renders the antigen-positive cells a cytoplasm dark brown staining. Slides were counterstained with Mayer's hematoxylin (DAKO, Carpinteria, CA, USA), dehydrated and coverslipped with a permanent mountant (Zymed, San Francisco, CA, USA).

Positive controls were included in each slide run. All controls (positive and internal) gave satisfactory results. In nonneoplastic breast tissues p63 should show nuclear positivity in myoepithelial cells. P-cadherin should present a distinctive membranous and occasionally cytoplasmic immunoreactivity in noneoplastic myoepithelial cells. Ck5 should stain myoepithelial cells of breast lobules and ducts.

Two pathologists (F.S and R.D.) evaluated the immunohistochemical staining. Because nonneoplastic mammary secretory cells do not express P-cadherin, either membranous or cytoplasmic immunoreactivity was considered positive when more than 5% of the neoplastic cells expressed this markers (Reis-Filho et al, 2003) (7). Similarly we adopted the same cut-off value for nuclear P63 and ER reactivity and for cytoplasmic Ck5 reactivity. Her2 was evaluated according to the four category system (0-3+) and considered positive when 3+ were attributed.

Statistical analysis

The χ^2 contingency test was used to test the association between two categorical variables and a p-value of < 0.05 was considered to reflect a significant association. The Odds ratio (OR) and its 95% confidence intervals (CI) were calculated to measure the strength of association between categorical variables. The StatView 5.0 (SAS Institute Inc., Cary, N.C.) program was used for this analysis.

RESULTS

Almost 62% of patients with positive family history for breast cancer were 50 years old or older at the moment of the diagnosis, but only 32% of the women were in this category ($p=0.007$). In both groups, the prevailing histology type was the ductal carcinoma NOS, but lobular and special type carcinomas were encountered only in patients with familial cancer. There were no differences in nuclear grade between the two groups (Table 2).

TMA validation

The expression of ER in the studied specimens was compared to that reported in medical files. Of the 118 cases, 111 were concordant (86 simultaneously positive and 25 simultaneously negative). Three were discordant and in four the analysis was technically impossible.

Characterization of familial and sporadic cancers

The expression of markers P-cadherin ($p=0.0004$), p63 ($p<0.0001$), Ki67 ($p<0.0001$) and CK5 ($p<0.0001$) were more frequent among familial breast cancers, whereas ER ($p=0.0286$) and HER2 ($p<0.0001$) expression were more frequently encountered in sporadic cancers. There were no statistical differences between the frequencies of BCL2 and pro-apoptotic p53 expressions in familial and sporadic cancers. The positive association of the basal cell markers with familial breast cancer was stronger for CK5 (OR=8.42) and p63 (OR=5.37) (Table 3).

The co-expression of P-cadherin, p63 or CK5, two-by-two, was associated with familial cancer. The strongest association of co-expression concomitantly present in two basal cell markers with familial breast cancer was for CK5 positive/ P63 positive (OR=34.24). Conversely, the strongest association of co-expression concomitantly absent with and sporadic breast cancer was for CK5 negative/p63 negative and CK5 negative/P-cadherin negative (OR=0.13) (Table 4).

The phenotypes according to gene expression profiling suggested by PEROU et al (2000) and SORLIE et al (2003) were also analyzed (Table 5). The

luminal B phenotype, corresponding to ER positive and HER2 positive, was more frequently found in sporadic breast cancer. The 10 women showing basal phenotype, corresponding to ER negative and HER2 negative, were familiar breast cancer. The difference between the distribution of gene expression phenotypes between familiar and sporadic breast cancer was statistically significant ($p < 0,0001$).

DISCUSSION

The current breast cancer classification system is based upon morphological features of the lesions. Even though the tumor grade is a prognostic marker, it is not likely that the molecular heterogeneity might be reflected in the histological appearance, nor that morphologically identical tumors might have a similar biological behavior. For the study of breast cancer, a number of biological markers may be used to define prognosis and to select the best therapy. The HER2 and ER status are good examples of markers with prognostic and predictive potentials.

The tumors analyzed in the present study were made up of familial and sporadic cancers. Because medical records were available, it was possible to analyze the associations between histopathological characteristics and clinical behavior of the disease. With the exception of metaplastic and mucinous types, the breast cancers are described as more frequent in patients with family history of the disease (Breast Cancer Linkage Consortium, 1997) (13).

The objective this study was to analyze the expression of the basal/mioepithelial markers (P63, Ck5 and P-Cadherin) in a familial and sporadic breast carcinomas by Tissue Microarrays.

The expression of these markers is frequently associated with the phenotype of putative staminal cells, or progenitors, of epithelial tissues, and their expression is lost with cell maturation BOECKER E BUERGER, 2003 (10); FOULKES, 2004 (14)). In breast tumors, P-Cadherin is involved with cell proliferation and

loss of differentiation (PERALTA SOLER et al, 1999) (15). By contrast, P63 expression confers the pluripotent phenotype of basal cells (DIRENZO, 2002)(16), and even more importantly, the expression of CK5 is characteristic of staminal and progenitor cells. The expression of these proteins confers a distinct phenotype. Familial cancers were, in this study, marked by the aberrant expression of these markers, contrasting with their sporadic counterparts, whose expression of basal markers was significantly lower. It was not surprising the co-expression of these markers in familial cancers. By their very nature, because they are more aggressive, less differentiated and have a putative histaminal origin, familial cancers have a worse prognosis. Foulkes et al (2003) (17), and Palacios et al (2003)(11), described similar phenotypes for breast cancers related to BRCA1 mutations, and the expression of CK5 and P-cadherin was linked to this histology type. It is necessary to emphasize that this study represents one the first attempts to assess the correlation of P63 with familial cancers. Therefore, we expect to encounter some of these mutations in the studied series, but the techniques to evaluate these mutations is expensive, time consuming, and difficult to implement.

This study corroborates the previous finding that ER receptor positivity is common among sporadic cancers, whereas the expression is infrequent in specimens obtained from patients with a familial history of breast cancer. The ER analysis is an important predictor of the presence of BRCA1 mutations. We refer the interest reader to an extensive analysis on this issue (VAZIRI et al. 2001) (18). Also of great importance is the association of age at diagnosis plus histology grade III and the presence BRCA1 mutations, as younger women, with negative ER, are more likely to have their BRCA1 mutated (**PALACIOS et al, 2003; VAZIRI et al. 2001) (11,18).**

The vast majority of studies on the expression of HER2 is in alignment in that the absence of expression of the transmembrane marker is related to BRCA1 and BRCA2 mutations, specially in familial cancers (**PALÁCIOS et al, 2003) (11).** Our study has similar results, because only 23% of the familial cancers

overexpressed the HER2 protein, whereas more than 57% of sporadic tumor overexpressed the HER2.

The Ki67 analysis disclosed differences in the proliferation index when comparing sporadic and familial cancers. Familial cancers presented a far more pronounced proliferation index when compared to their sporadic counterparts, underscoring the hypothesis that familial cancers are more proliferative (Osin e Lakhani, 1999)(19).

We believe that the analysis of markers such as CK5, P-Cadherin and P63 is important in determining the possible factors related to histogenesis in familial breast cancers. Our results allow us to suggest that sporadic (luminal) and familial (basal) cancers stem from different progenitor cells. This is an open and vast field for research, because these markers may be sufficient to select women for the analysis of BRCA1 and BRCA2 mutations.

REFERENCES

1- Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lonning PE, Borresen-Dale AL, Brown PO e Botstein D. 2000. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406:747-752.

2- Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, Deng S, Johnsen H., Pesich R, Geisler S, Demeter J, Perou CM, Lonning PE, Brown PO, Borresen-Dale AL, e Botstein D. 2003. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100:8418-8423.

3- Lakhani S. R., Easton D. F., Stratton M. R., the Breast Cancer Linkage Consortium. Pathology of familial breast cancer: differences between breast cancers in carriers of *BRCA1* or *BRCA2* mutations and sporadic cases. *Lancet*, 349: 1505-1510, 1997.

4-Lakhani SR, Jacquemier J, Sloane JP, Gusterson BA, Anderson TJ, van de Vijver MJ, Farid LM, Venter D, Antoniou A, Storer-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 Aug 5;90(15):1138-45

5- van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, Peterse HL, van der Kooy K, Marton MJ, Witteveen AT, Schreiber GJ, Kerkhoven RM, Roberts C, Linsley PS, Bernards R e Friend SH. 2002. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 415:530-536

6-Reis-Filho JS, Simpson PT, Martins A, Preto A, Gartner F e Schmitt FC 2003. Distribution of p63, cytokeratins 5/6 and 14 in 51 normal and 400 neoplastic human tissue samples using TARP-4 multi-tumor tissue microarray. *Virchows Arch.* 443:122-132.

7 - Boecker W, Moll R, Poremba C, Holland R, Van Diest PJ, Dervan P, Burger H, Wai D, Ina DR, Brandt B, Herbst H, Schmidt A, Lerch MM, e Buchwallow IB. 2002. Common adult stem cells in the human breast give rise to glandular and myoepithelial cell lineages: a new cell biological concept. *Lab. Invest.* 82:737-746.

8- Lakhani SR e O'Hare MJ 2001.The mammary myoepithelial cell - Cinderella or ugly sister *Breast Cancer Res.*3:1-4.

9 -Lakhani SR, Manek S, Penault-Llorca F, Flanagan A, Arnout L, Merrett S, McGuffog L, Steele D, Devilee P, Klijn JG, Meijers-Heijboer H, Radice P, Pilotti S, Nevanlinna H, Butzow R, Sobol H, Jacquemier J, Lyonnet DS, Neuhausen SL, Weber B, Wagner T, Winqvist R, Bignon YJ, Monti F, Schmitt F, Lenoir G, Seitz S, Hamman U, Pharoah P, Lane G, Ponder B, Bishop DT, Easton DF.Pathology of ovarian cancers in BRCA1 and BRCA2 carriers. *Clin Cancer Res.* 2004 Apr 1;10(7):2473-81

- 10.Boecker W e Buerger H. 2003. Evidence of progenitor cells of glandular and myoepithelial cell lineages in the human adult female breast epithelium: a new progenitor (adult stem) cell concept. *Cell Prolif.* 36 Suppl 1:73-84.
- 11-Palacios J, Honrado E, Osorio A, Cazorla A, Sarrio D, Barroso A, Rodriguez S, Cigudosa JC, Diez O, Alonso C, Lerma E, Sanchez L, Rivas C e Benitez J. 2003. Immunohistochemical characteristics defined by tissue microarray of hereditary breast cancer not attributable to BRCA1 or BRCA2 mutations: differences from breast carcinomas arising in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Clin. Cancer Res.* 9:3606-3614.
- 12 -McKeon F. 2004. p63 and the epithelial stem cell: more than status quo? *Genes Dev.* 18:465-469.
- 13-Breast Cancer Linkage Consortium. 1997. Pathology of familial breast cancer: differences between breast cancers in carriers of BRCA1 or BRCA2 mutations and sporadic cases. *Lancet* 349:1505-1509.
- 14-Foulkes WD. 2004. BRCA1 functions as a breast stem cell regulator. *J Med. Genet.* 41:1-5.
- 15 -Peralta Soler A, Knudsen AK, Salazar H, Han AC a Keshgegian. 1999. P-cadherin Expression in Breast Carcinoma Indicates Poor Survival. *Cancer* 86:1263:1272.
- 16.DiRenzo J, Signoretti S, Nakamura N, Rivera-Gonzalez R, Sellers W, Loda M e Myles Brown. 2002. Growth Factor Requirements and Basal Phenotype of an Immortalized Mammary Epithelial Cell Line. *Cancer Res.* 62:89-98.
- 17.Foulkes WD, Ingunn M, Stefansson S, Chappuis PO, Bégin LR, Goffin JR, Wong N, Trudel M e Asklen LA. 2003. Germline BRCA1 mutations and a Basal Epithelial Phenotype in Breast Cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 95:1482-5.
- 18.Vaziri SA, Krumroy LM, Elston L, Budd GT, Darlington G, Myles J, Tubbs RR e Casey G. 2001. Breast tumour immunophenotype of BRCA1- mutation carriers is influenced by age at diagnosis. *Clin. Cancer Res.* 7:1937-1945.
- 19.Osin PP e Lakhani SR. 1999. The pathology of breast cancer-Immunohistochemistry and molecular analysis. *Breast Cancer Res* 1:36-40.

Table 1: Antibodies used in the immunohistochemical study

Anticorpo	Clone	Dilution	Supplier
BCL2	NCL-L-Bcl2	1:10	Novocastra, UK
CiK5	XM26	1:80	Neomarkers, USA
ER α	SP-1	1:20	Neomarkers, USA
HER2 (c-erbB-2)	NCL-L-CB11	1:60	Novocastra, UK
Ki 67	SP6	1:300	Neomarkers, USA
P-caderina	56	1:50	BD Transduction, KY
P53	DO-7	1:40	Neomarkers, USA
P63	4A4	1:150	Neomarkers, USA

Table 2: Distribution of morphological characteristics breast cancer

	Familial cancer n (%)	Sporadic cancer n (%)	<i>p</i>
Years of age of diagnosis			
< 50	29 (61.7)	38 (32.2)	0.007
> 50	18 (38.3)	80 (67.8)	
Tumor type			
Ductal invasive	40 (86.8)	117 (99.2)	0.0235
Ductal <i>in situ</i>	2 (4.4)	1 (0.8)	
Lobular invasive	1 (2.2)	0	
Metaplastic	1 (2.2)	0	
Mucinous	1 (2.2)	0	
Medular	1 (2.2)	0	
Grade			
I	6 (15)	21 (17.8)	NS (0.8662)
II	16 (40)	49 (41.5)	
III	18 (45)	48 (40.7)	

NS – No statistical significance difference

Table 3: Distribution of immunohistochemical characteristics in familial and sporadic breast cancer

	Familial cancer	Sporadic cancer	OR(CI95%)	p
	n (%)	n (%)		
ER				
Positive	30 (61.2)	91 (78.8)	0.45(0.21-0.99)	0,0286
Negative	19 (38.8)	26 (22.2)		
HER2				
Positive (+++)	11 (22.9)	56 (57.1)	0.22(0.09-0.52)	<0,0001
Negative (0/+ /++)	37 (77.1)	42 (42.9)		
P-Caderin				
Positive	25 (51.1)	21 (21.9)	3.72(1.67-8.36)	0.0004
Negative	24 (48.9)	75 (78.1)		
P63				
Positive	19 (40.4)	12 (11.2)	5.37(2.16-13.53)	< 0,0001
Negative	28 (59.6)	95 (88.8)		
CK5				
Positive	23 (48.9)	10 (9.8)	8.42(3.43-23.15)	<0,0001
Negative	24 (51.1)	92 (90.2)		
BCL2				
Positive	28 (63.6)	50 (53.2)	1.54(0.69-3.34)	NS (0.2487)
Negative	16 (36.4)	44 (46.8)		
P53				
Positive	3 (6.9)	13 (14.9)	0.42(0.09-1.70)	NS (0.1798)
Negative	41 (93.1)	74 (85.1)		
Ki-67				
0	23 (51.2)	82 (88.2)	Reference	
> 0-5%	6 (13.3)	6 (6.4)	0.28 (0.07-1.10)	<0.0001
> 5-25%	15 (33.3)	5 (5.4)	0.09 (0.03-0.31)	
> 25%	1 (2.2)	0	-	

NS – No statistical significance difference

Table 4: Distribution of co-expression phenotype basal immunohistochemical characteristics in familial and sporadic breast cancer

Profile *	Familial cancer n (%)	Sporadic cancer n (%)	OR(CI95%)	p
Pcad+/ Ck5+				
Present	14 (29.8)	6 (6.7)	6.46 (2.07-20.9)	0.0003
Absent	30 (70.2)	83 (93.3)		
Pcad-/ Ck5-				
Present	14 (29.1)	68 (76.4)	0.13 (0.05-0.30)	< 0,0001
Absent	34 (70.9)	21 (23.6)		
Pcad+/ P63+				
Present	12 (25)	3 (3.3)	9.89 (2.39-47.23)	< 0,0001
Absent	36 (75)	89 (96.7)		
Pcad-/ P63-				
Present	15 (32.6)	63 (68.5)	0.22 (0.10-0.51)	< 0,0001
Absent	31 (67.4)	29 (31.5)		
Ck5+/ P63+				
Present	12 (26.1)	1 (1)	34.24 (4.33-731.14)	< 0,0001
Absent	34 (73.9)	97 (99)		
Ck5-/ P63-				
Present	17 (36.9)	80 (81.6)	0.13 (0.06-0.31)	< 0,0001
Absent	29 (63.1)	18 (18.4)		

* The positive cases were the perfil in analysis, another cases were considered negative.

Table 5: Distribution of immunoprofile of familial breast and sporadic cancer.

Phenotype	Expression of RE/HER2	Familial cancer n (%)	Sporadic cancer n (%)	<i>p</i>
Luminal A	+/-	26 (55.3)	40 (42.1)	<0,0001
Luminal B	+/+	3 (6.4)	39 (41)	
Basal	-/-	10 (21.3)	0	
HER2	-/+	8 (17)	16 (16.9)	

4. Discussão

Embora apenas 5% a 10% do câncer de mama seja hereditário, a incidência atual desta neoplasia, o alto risco destas famílias e a possibilidade de intervenção preventiva tornam relevante o estudo destes casos. Entretanto, estão descritas centenas de mutações diversas e a maioria das mutações nos dois principais genes de susceptibilidade, *BRCA1* e *BRCA2*, tem origem geográfica distinta, embora algumas sejam partilhadas por várias populações. Dos 31 casos estudados e selecionados de acordo com os critérios adotados pelo *Breast Cancer Linkage Consortium* para o câncer hereditário, foram identificadas quatro mutações (13%), sendo uma mutação no gene *BRCA1* e três no gene *BRCA2*. A mutação do gene *BRCA1* foi originalmente descrita nos judeus de Ashkenazi, estando claramente associada com o aumento da susceptibilidade para o câncer de mama (STRUEWING et al., 1997). Levando em conta a alta prevalência de descendentes dos judeus Ashkenazi na população brasileira, não é surpresa o encontro desta mutação neste grupo de pacientes (KOIFMAN et al, 2001). Dentre as três mutações encontradas no gene *BRCA2*, duas são do tipo *nonsense*, designadas como S2219X. Recentemente esta mutação foi encontrada na

população espanhola de Castilha-Leon (DURAN et al., 2003), porém no presente caso não foi encontrada relação específica com ancestrais espanhóis. A terceira mutação foi considerada do tipo *unclassified variant*.

Uma vez que as mutações dos genes *BRCA1* e *BRCA2* podem estar presentes em toda parte do gene, não há um método ideal para pesquisar mutações em ambos os genes. O seqüenciamento do DNA tem como vantagem detectar mutações específicas e de *novo* e estudar todo o gene. Então, além de selecionar as pacientes de acordo com critérios clinico-patológicos (ALVARENGA et al., 2003) o estudo de populações com mutações específicas, dentro do contexto do aconselhamento genético, torna possível o conhecimento de como ela se agrega na família em relação aos casos de câncer, propiciando a estratificação prognóstica individual do risco cumulativo, contribuindo para que o rastreamento seja mais direcionado, o que em muito facilita e diminui os custos da pesquisa.

É esperado que em mulheres com alterações genéticas que conferem maior susceptibilidade ao câncer de mama também ocorram cânceres esporádicos. O inverso também é verdadeiro, pois mulheres com cânceres de mama caracterizados como esporádicos podem ter componente genético hereditário associado. Para que um câncer ocorra é necessário que haja alterações genéticas não herdadas, mesmo em mulheres portadoras de mutações nos genes *BRCA1* ou *BRCA2*. A presença de mutação nestes genes não é suficiente para o desenvolvimento de um câncer, mas a dependência de outras alterações genéticas é menor. Uma mulher com câncer hereditário de mama, com base no heredograma familiar, pode apresentar alta percentagem de mutações dos genes *BRCA1* e

BRCA2. Portanto, estes fatos sugerem que devem haver genes ainda desconhecidos que conferem às mulheres alta susceptibilidade para desenvolver um câncer de mama.

O segundo objetivo proposto foi analisar a frequência de polimorfismo nos genes *XRCC1*, *XPB*, *XRCC3* e *RAD51* em um grupo de pacientes brasileiras e a sua associação com a susceptibilidade ao câncer de mama. Não foi observada qualquer diferença estatisticamente significativa na frequência dos alelos e dos genótipos nos quatro genes de reparo do DNA estudados nos quatro grupos de pacientes que participaram desta pesquisa.

A manutenção da estabilidade gênica, como o controle da duplicação do DNA, é uma competência necessária para evitar que uma célula torne-se um câncer. Este mecanismo parece ser complexo e muitos genes devem estar envolvidos. Os genes de reparo do DNA, como o *XRCC1*, *XRCC2*, *XPB* e *RAD51* parecem ter algum papel, o que torna necessário conhecer o efeito ou associação de seus polimorfismos com a maior susceptibilidade ao câncer de mama e outros cânceres. Neste estudo não se identificou associação da presença e variação de alguns polimorfismos destes genes, o que também é uma informação que colabora para o melhor conhecimento deste processo. O tamanho amostral das mulheres com câncer de mama poderia não ter sido suficiente para mostrar verdadeiras diferenças entre os grupos, entretanto temos que considerar que ainda não há consenso entre a associação destes polimorfismos e risco de câncer de mama. Ainda, estes mesmos genes apresentam outros polimorfismos além daqueles estudados e podem interagir com outros fatores de risco para câncer.

Outro objetivo proposto por este estudo foi avaliar a expressão de marcadores basais como a P-Caderina, P63 e CK5 em uma série de cânceres de mama familiar e esporádico. A expressão destes marcadores está associada ao fenótipo basal/mioepitelial (BOECKER e BUERGER, 2003; FOULKES, 2004). Os cânceres familiares foram, neste estudo, caracterizados pela expressão destes marcadores, ao contrário dos esporádicos, cuja expressão dos marcadores basais foi significativamente inferior.

Os estudos com *cDNA microarray* de PEROU et al., (2000) e de SORLIE et al. (2003), envolveram mais de 8000 genes, a partir do qual foram caracterizados diferentes fenótipos do câncer de mama. Este cenário aponta que há uma interação muito grande de genes no processo carcinogênico. Todavia, esta tecnologia, no momento, não é aplicável na prática clínica. É necessário, portanto, identificar marcadores que representem estes espectros genéticos através de técnicas disponíveis para a prática clínica.

Neste sentido, este estudo ofereceu uma contribuição à medida que mostrou que as proteínas associadas ao fenótipo de células basais estão mais freqüentemente presentes nos cânceres familiares e muito freqüentemente ausentes nos cânceres considerados esporádicos, que seguem o padrão luminal.

Estudo de ALMEIDA et al. (2003) mostrou que 85% os casos de carcinoma ductal *in situ* (CDIS) tiveram o fenótipo HER2+/RE- ou HER2-/RE+, enquanto que 66% dos casos de carcinoma ductal invasivo apresentaram os mesmos fenótipos. O

fenótipo HER2-/RE-, que está associado ao fenótipo basal (PEROU et al., 2000), esteve presente em apenas 6% dos CDIS e em 20% dos carcinomas invasivos.

Os estrogênios que se ligam aos RE localizados no núcleo da célula e os fatores de crescimento que se ligam à proteína HER-2 localizada na membrana celular representam duas vias distintas de estímulos da proliferação celular, de origem externa à célula. Então é admissível hipotetizar que quando estas lesões não expressam a proteína HER2 nem RE, os estímulos para proliferação celular seriam determinados por fatores internos à célula ou pelo menos seriam menos dependentes de estímulos externos. Ainda, o câncer invasivo da mama seria mais freqüentemente dependente destes fatores internos à célula do que o CDIS, o que corresponde à competência para invadir o estroma.

PEROU et al., (2000) caracterizaram o câncer de mama do subtipo basal como sendo RE e HER-2 negativos. Assim, seriam aqueles que a proliferação celular dependeria menos de estímulos externos. VAN'T VEER et al., (2002) mostraram que mulheres portadoras de mutação dos genes *BRCA1* apresentam câncer de mama com padrão de expressão gênica compatível com subtipo basal. Portanto, a carcinogênese do epitélio da mama em mulheres com alterações genéticas que conferem alta susceptibilidade para tal não seria dependente dos RE nem da expressão da proteína HER-2, pois os estímulos necessários para a proliferação celular seriam determinados pelas alterações presentes no genoma da célula. É evidente que esta explicação não exclui a possibilidade de que estas células também possam ter RE e expressão da proteína HER-2.

Os resultados deste estudo são coerentes com esta teorização sobre carcinogênese, pois mostrou que os cânceres familiares são mais freqüentemente RE negativo e proteína HER-2 negativa que os cânceres esporádicos. Além disso, os marcadores p-cad, p63 e CK5 mostraram que os cânceres familiares apresentam mais freqüentemente expressão compatível com o subtipo basal, enquanto que os esporádicos apresentam, via de regra, freqüência muito baixa de expressão destes marcadores.

Ainda cabe pesquisar se as mutações para os genes de susceptibilidade ao câncer de mama neste grupo de tumores definidos como sendo do subtipo basal, a fim de comprovar se estes marcadores são realmente suficientes para tal rastreio.

5. Conclusões

1. Foram identificadas uma mutação no gene *BRCA1* e três mutações no gene *BRCA2* em mulheres com câncer de mama e história familiar de câncer de mama, o que correspondeu a uma frequência de 13% (4/31).
2. Não foi observada associação da susceptibilidade ao câncer de mama com os polimorfismos dos genes *XRCC1*, *XPB*, *XRCC3* e *RAD51* em um grupo de pacientes brasileiras.
3. Os marcadores p63, CK5 e P-caderina foram mais frequentemente expressos nos cânceres de mama familiares. A melhor caracterização do câncer familiar como entidade biológica distinta do câncer esporádico pode ser uma ferramenta útil para selecionar mulheres que deveriam submeter-se ao rastreamento de mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2*.

6. Referências Bibliográficas

ALMEIDA O. **Hipóteses sobre a evolução do carcinoma ductal *in situ* da mama com base nas expressões das proteínas bcl-2, c-erbb-2, p53 e nos receptores de estrógeno.** Campinas, 2003. [Tese - Doutorado - Faculdade de Ciências Médicas/UNICAMP].

ALVARENGA, M.; COTTA, A.C.; DUFLOTH, R.; SCHMITT, F. Contribuição do Patologista cirúrgico para o diagnóstico das síndromes do câncer hereditário e avaliação dos tratamentos cirúrgicos profiláticos. **J Bras Patol Med Lab**, 39:167-77, 2003.

ALI, S.E.; COOMBES, R.C. Endocrine-responsive breast cancer and strategies for combatig resistance. **Nature Rev Cancer**, 2:101-12, 2002.

ANDERSEN, T.I. Genetic heterogenety in breast cancer susceptibility. **Acta Oncol**, 35:407-10, 1996.

ANTONIOU, A.C.; EASTON, D.F. Polygenic inheritance of breast cancer: implications for design of association studies. **Genet Epidemiol**, 25:190-202, 2003.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Breast Cancer – Facts & Figures 2003-2004. **American Cancer Society, Inc.. 2003.**

BASELGA, J.; E NORTON, L. Focus on breast cancer. **Cancer Cell**, 1:319-22, 2002.

BIRNBAUM, D.; BERTUCCI, F.; GINESTIER, C. et al. Basal and luminal breast cancers: basic or luminous? **Int J Oncol**, 25:249-58, 2004.

BOECKER, W.; MOLL, R.; POREMBA, C. et al.- Common adult stem cells in the human breast give rise to glandular and myoepithelial cell lineages: a new cell biological concept. **Lab Invest**, 82:737-46, 2002.

BOECKER, W.; BUERGER, H. Evidence of progenitor cells of glandular and myoepithelial cell lineages in the human adult female breast epithelium: a new progenitor (adult stem) cell concept. **Cell Prolif**, 36:73-84, 2003.

BOHR VA. DNA repair fine structure and its relations to genomic instability. **Carcinogenesis**, 16:2885-92, 1995.

BONDY, M.L.; LUSTBADER, E.D.; HALABI, S. et al. Validation of a breast cancer risk assesment model in women with a positive family history. **J Natl Cancer Inst**, 86:620-5, 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer (INCA). Estimativas da incidência e mortalidade por câncer. Rio de Janeiro, RJ: INCA, 2003.

BRAITHWAITE, E.; WU, X.; WANG, Z. Repair of DNA lesions: mechanisms and relative repair efficiencies. **Mutat Res**, 424:207-19, 1999.

BREAST CANCER LINKAGE CONSORTIUM. Pathology of familial breast cancer: differences between breast cancers in carriers of *BRCA1* or *BRCA2* mutations and sporadic cases. **Lancet**, 349:1505-9, 1997.

BRODY, L.; BIESECKER, B. Breast cancer susceptibility genes, *BRCA1* and *BRCA2*. **Medicine**, 77:208-26, 1998.

CALLAGY, G.; CATTANEO, E.; DAIGO, Y. et al. Molecular Classification of Breast Cancers Using Tissue Microarrays. **Diagn Mol Pathol**, 12:27-34, 2003.

CALDECOTT, K.W.; AOUFOUCHI, S.; JOHNSON, P. et al. XRCC1 polypeptide interacts with DNA polymerase beta and possibility poly (ADP-ribose) polymerase, and DNA ligase III is a novel molecular 'nick-sensor' in vitro. **Nucleic Acids Res**, 24: 4387-94, 1996.

CLAUS, E.B.; RISCH, N.; THOMPSON, W.D. Autosomal dominant inheritance of early-onset breast cancer: implications for risk prediction. **Cancer**, 73:643-51, 1994.

CHUNG, C.H.; BERNARD, P.S.; PEROU, C.M. Molecular portraits and the family tree of cancer. **Nature Genet**, 32:533-40, 2002.

COLDITZ, G.A.; WILLETT, W.C.; HUNTER, D.J. et al. Family history, age, and risk of breast cancer. **JAMA**, 270:338-43, 1993.

DICKSON, R.B.; LIPPMAN, M.E. Growth factors in breast cancer. **Endocr Rev**, 16:559-95, 1995.

DEUGNIER, M.A.; TEULIÈRE, J.; FARALDO, M.M. et al. The importance of being a myoepithelial cell. Breast **Cancer Res**, 4:224-30, 2002.

DIRENZO, J.; SIGNORETTI, S.; NAKAMURA, N. et al. Growth Factor Requirements and Basal Phenotype of an Immortalized Mammary Epithelial Cell Line. **Cancer Res**, 62:89-98, 2002.

DUARTE, F.; CAMESELLE-TEIJEIRO, J.F.; SOARES, R. et al. Analysis of mutations in genes BRCA 1 and BRCA 2 among patients with breast and ovarian cancer in northern Portugal and Galicia. **Rev Clin Esp**, 5:259-63, 2002.

DUELL, E.J.; HOLLY, E.A.; BRACCI, P.M. et al. A population-based study of the Arg399Gln polymorphism in X-ray repair cross complementing group 1 (XRCC1) and risk of pancreatic adenocarcinoma. **Cancer Res**, 62:4630-6, 2002.

- DURAN, M.; ESTEBAN-CARDENOSA, E.; VELASCO, E. et al. Mutational analysis of *BRCA2* in Spanish breast cancer patients from Castilha-Leon: identification of four novel truncating mutations. ***Hum Mutat***, 21:448, 2003.
- EASTON, D.F.; BISHOP, D.T.; FORD, D. et al. Genetic linkage analysis in familial breast cancer and ovarian cancer: Results from 214 families. ***Am J Hum Genet***, 52:678-701, 1993.
- FRANK, T.S.; MANLEY, S.A.; OLOPADE, O.I. et al – Sequence analysis of *BRCA1* and *BRCA2*: correlation of mutations with family history and ovarian cancer risk. ***J Clin Oncol***, 16:2417-25, 1998.
- FOULKES, W.D.; INGUNN, M.; STEFANSSON, S. et al. Germline *BRCA1* mutations and a Basal Epithelial Phenotype in Breast Cancer. ***J Natl Cancer Inst***, 95:1482-5, 2003.
- FOULKES WD. *BRCA1* functions as a breast stem cell regulator. ***J Med. Genet.*** 41:1-5, 2004.
- GAHAFOOR, A.; JEMAL, A.; WARD, E. et al. Trends in breast cancer by race and ethnicity. ***CA Cancer J Clin*** 53:342-355, 2003.
- GAMALLO, C.; MORENO-BUENO, G.; SARRIO, D. et al. The prognostic significance of P-cadherin in infiltrating ductal breast carcinom. ***Mod Pathol***, 14:650-4, 2001.
- HAN, A.C.; SOLER, A.P.; KNUDSEN, K.A. et al. Distinct cadherin profiles in special variant cânceres and other tumors of breast. ***Hum Pathol***, 30:1035-9, 1999.
- HALL, J.; LEE, M.; NEWMAN, B. et al. Linkage of early onset familial breast cancer to chromosome 17q21. ***Science***, 250:1684-9, 1990.
- HABER, A.D.; FEARON, E.R. The promise of cancer genetics. ***Lancet***, 351:1-8, 1998.

HELZSOUER, K.J.; HARRIS, E.L.; PARSHAD, R. et al. DNA repair proficiency: potencial susceptibility factor for breast cancer. **J Natl Cancer Inst.**, 88:754-5, 1996.

HOSKINS, K.F.; STOPFER, J.E.; CALZONE, K.A. et al. Assessment and counseling for women with a family history of breast cancer – A guide for clinicians. **JAMA**, 273:577-85, 1995.

INCA. Instituto Nacional Do Câncer. Estimativa de Incidência e Mortalidade por Câncer no Brasil . 2003 Acesso – 22/08/2004. Disponível na internet: <<http://www.inca.gov.br>>.

JARA, L.; AMPUERO, S.; SECCIA, L. et al. Frecuencia de la mutación 185delAG en el gen *BRCA1* en mujeres chilenas sanas con antecedentes familiares de câncer de mama [Frequency of the 185delAG mutation in the *BRCA1* gene in Chilean healthy women with family history of breast cancer. **Rev Med Chil**, 130:1113-23, 2002.

JIRICNY, J.; NYSTROM-LAHTI, M. Mismatch repair defects in cancer. **Curr Opin Genet Dev**, 10:157-61, 2000.

KATO, M.; YANO, K.; MATSUO, F. et al. Identification of *RAD51* alteration in patients with bilateral breast cancer. **J Hum Genet**, 45:133-7, 2000.

KOIFMAN, S.; KOIFMAN, R. Breast cancer mortality among Ashkenazi Jewish women in São Paulo and Porto Alegre, Brazil. **Breast Cancer Res**, 3:270-5 2001.

KLIGERMAN, J. O câncer como um indicador de saúde no Brasil (Editorial). **Rev Bras Cancerol**, 45, 1999.

LAKHANI, S.R.; O'HARE, M.J. The mammary myoepithelial cell - Cinderella or ugly sister. **Breast Cancer Res**, 3:1-4, 2001.

LIDEREAU, R. Major improvement in the efficacy of *BRCA1* mutation screening using morphoclinical features of breast cancer. **Cancer Res**, 60:1206-10, 2000.

LIU, N.; LAMERDIN, J.E.; TEBBS, R.S. et al. XRCC2 and XRCC3, new human RAD51-family members, promote chromosome stability and protect against DNA cross-links and other damages. **Mol Cell.**, 1:783-93, 1998.

LEVY-LAHAD, E.; LAHAD, A.; EISENBERG, S. et al. A single nucleotide polymorphism in the RAD51 gene modifies cancer risk in BRCA2 but not BRCA1 carriers. **Proc Natl Acad Sci**, 98:3232-6, 2001.

LYNCH, H.T.; WATSON, P.; CONWAY, T.A. et al. Clinical/genetic features in hereditary breast cancer. **Breast Cancer Res Treat**, 15:63-71, 1990.

MARTIN, A.M.; WEBER, B.L. Genetic and hormonal risk factors in breast cancer. **J Natl Cancer Int**, 92:1126-35, 2000.

MARCHBANKS, P.A.; Mc DONALD, J.A.; WILSON, H.G. et al. Oral contraceptives and the risk of breast cancer. **N Engl J of Med**, 346:2025-32, 2002.

MARCUS, J.N. et al. Hereditary Breast Cancer: pathobiology, prognosis and BRCA1 and BRCA2 gene linkage. **Cancer**, 77:697-709, 1996.

MANDHAVAN, M.; SRINIVAS, P.; ABRAHAM, E. et al. Cadherins as predictive markers of nodal metastasis in breast cancer. **Mod. Pathol.**, 14:423-7, 2001.

MATULLO, G.; PALLI, D.; PELUSO, M. et al. XRCC1, XRCC3, XPD gene polymorphisms, smoking and (32) P-DNA adducts in a sample of healthy subjects. **Carcinogenesis**, 22:1437-45, 2001.

MCKEON, F. p63 and the epithelial stem cell: more than status quo? **Genes Dev**, 18:465-9 2004.

MIKI, Y.; SWENSEN, J.; SHATTUCK-EIDENS, D. et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. **Science**, 266:66-71, 1994.

MITRA, A.K.; FARUQUE, F.S.; AVIS, A.L. Breast cancer enviromental risks: where is the link? **J Environ Health**, 66:24-32, 2004.

MEIJERS-HEIJBOER, H.; WIJNEN, J.; VASEN, H. et al. The Check 1100delC mutation identifies families with a hereditary breast and colorectal cancer phenotype. **Am J Hum Genet**, 72:1308-14, 2003.

NAROD, S.; FEUNTEUN, J.; LYNCH, H. et al. Familial breast-ovarian cancer locus on chromosome 17q12-q23. **Lancet**, 338: 82-3, 1991.

NATHANSON, K.L.; WOOSTER, R.; WEBER, B.L. Breast cancer genetics: what we know and what we need. **Nat Med**, 7:552-6,2001.

NIEDORF, K.B.; SHANNON, K.M. The role of genetic testing and effect on patient care. **Arch Dermatol**, 137:1515-9, 2001.

PALACIOS, J.; HONRADO, E.; OSORIO, A. et al. Immunohistochemical characteristics defined by tissue microarray of hereditary breast cancer not attributable to *BRCA1* or *BRCA2* mutations: differences from breast carcinomas arising in *BRCA1* and *BRCA2* mutation carriers. **Clin Cancer Res**, 9:3606-14, 2003.

PALACIOS, J.; HONRADO, E.; OSORIO, A. et al. RE: Germline *BRCA1* mutations and a Basal Epithelial Phenotype in Breast Cancer. **J Natl Cancer Inst** 96:712-714, 2004.

PALLI, D. et al. DNA adduct levels and DNA repair polymorphisms in traffic-exposed workers and a general population sample. **Int J Cancer**, 94:121-7, 2001.

PAREDES, J.; MILANEZI, F.; REIS-FILHO, J.S. et al. Aberrant P-cadherin expression: is it associated with estrogen-independent growth in breast cancer? **Pathol Res Pract**, 198:795-801, 2002.

PARMIGIANI, G.; BERRY, D.A.; AGUIAR, O. Determining carrier probabilities for breast cancer susceptibility genes *BRCA1* and *BRCA2*. ***Am J Hum Genet***, 62:145-58, 1998.

PEROU, C.M.; SORLIE, T.; EISEN, M.B. et al. Molecular portraits of human breast tumours. ***Nature***, 406:747-52, 2000.

PERALTA; SOLER, A.; KNUDSEN, A.K.; SALAZAR, H. et al - 1999. P-cadherin Expression in Breast Câncer Indicates Poor Survival. ***Cancer***, 86:1263-72, 1999.

PHAROAH, P.D.; DAY, N.E.; DUFFTY, S. et al. Family history and the risk of breast cancer: A systematic review and meta-analysis. ***Int J Cancer***, 71: 800-9, 1997.

REIS-FILHO, J.S.; SIMPSON, P.T.; MARTINS, A. et al. Distribution of p63, cytokeratins 5/6 and 14 in 51 normal and 400 neoplastic human tissue samples using TARP-4 multi-tumor tissue microarray. ***Virchows Arch***, 443:122-32, 2003.

REIS-FILHO, J.S.; MILANEZI, F.; PAREDES, J. et al. Novel and classic myepithelial/stem cell Markers in metaplastic Cânceres of the Breast. ***App Immunohist Mol Morph***, 11:1-8, 2003.

RUBIN, S.C. et al. Clinical and pathological features of ovarian cancer in women with germ-line mutations of *BRCA1*. ***N Engl J Med***, 335:1413-6, 1996.

SZABO, C.S.; KING, M.C. Population genetics of *BRCA1* and *BRCA2*. ***Am J Hum Genet***, 60:1013-21, 1997.

SOCIEDADE PORTUGUESA DE SENOLOGIA disponível na Internet
<http://www.spsenologia.pt/reu00401.html> em 11.11.04.

SORLIE, T.; TIBSHIRANI, R.; PARKER, J. et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. ***Proc Natl Acad Sci USA***, 100:8418-23, 2003.

SCHMITT, F.C.; REIS FILHO, J.S.; MILANEZI, F. et al. - Patología del cáncer de mama hereditario. **Rev Senología y Patol Mam**, 14: 29-35, 2001.

SLATTERY, M.L.; KERBER, R.A. A comprehensive evaluation of family history and breast cancer risk: The Utah population database. **JAMA**, 270:1563-8, 1993.

SOARES, R.; AMENDOEIRA, I.; MONTEIRO, P. et al. *BRCA1* mutation analysis in a Portuguese population with early-onset breast and/or ovarian cancer. **Dis Markers**, 15:93, 1999.

STRUEWING, J.P. The risk of cancer associated with specific mutations of *BRCA1* and *BRCA2* among Ashkenazi Jews. **N Engl J Med**, 336:1401-8, 1997.

STURGIS, E.M.; CASTILHO, E.J.; LI, L. et al. Polymorphisms of DNA repair gene *XRCC1* in squamous cell carcinoma of the head and neck. **Carcinogenesis**, 20:2125-9, 1999.

THE CHECK-2 BREAST CANCER CASE-CONTROL CONSORTIUM. Ccheck2 1100delC and susceptibility to breast cancer: a collaborative analysis involving 10,860 breast cancer cases and 9,065 controls from 10 studies. **Am J Hum Genet**, 74: 1175-182, 2004.

TONIN, P.; WEBER, B.; OFFIF, K. et al. Frequency of recurrent *BRCA1* and *BRCA2* mutations in Ashkenazi jewish breast cancer families. **Nat Med**, 2: 1179-83, 1996.

VAN DE RIJN, M.; PEROU, C.M.; TIBSHIRANI, R. et al. Expression of cytokeratins 17 and 5 identifies a group of breast cancers with poor clinical outcome. **Am J Pathol**, 161:1991-6, 2002.

VAN 'T VEER, L.J.; DAI, H.; VAN DE VIJVER, M.J. et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. **Nature**, 415:530-6, 2002.

WESTFALL, M.D.; PIETENPOL, J. p63: molecular complexity in development and cancer. ***Carcinogenesis***, 25:857-864, 2004.

WETZELS, R.H.; KUIJPERS, H.J.; LANE, E. B. et al. Basal cell-specific and hyperproliferation-related keratins in human breast cancer. ***Am J Pathol***, 138:751-63, 1991.

WOOSTER, R. et al. Localization of a breast cancer susceptibility gene, *BRCA2*, to chromosome 13q12-13. ***Science***, 265:2088-90, 1994.

ZWEEMER, R.P. et al. Clinical and genetic evaluation of thirty ovarian cancer families. ***N Engl J Med***, 178:85-90, 1998.

7. Bibliografia de Normatizações

FRANÇA, J. L.; BORGES, S. M.; VASCONCELLOS, A. C.; MAGALHÃES, M. H. A. – **Manual para normatização de publicações técnico-científicas**. 4^a ed., Editora UFMG, Belo Horizonte, 1998. 213p.

Normas e procedimentos para publicação de dissertações e teses. Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP. Ed. SAD – Deliberação CCPG-001/98 (alterada 2002).

8. Anexos

8.1. Anexo 1

1.1. Construção do Tissue MicroArray



O TMA Builder é composto por um molde, para construção de um bloco receptor com 24 poços de 2mm de diâmetro numa grelha 6 X 4, e por uma seringa extractora.

1.1.1 Construção do bloco recipiente



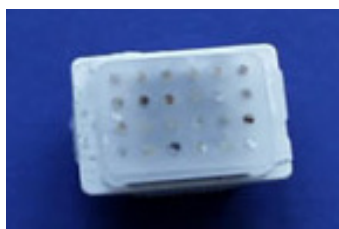
É colocada uma cassette no topo do TMA Builder sobre o qual é vertida a parafina líquida. O bloco receptor é retirado do molde após arrefecimento da parafina.

1.1.2 Selecção das áreas dos blocos dadores



A área de interesse é seleccionada ao microscópio óptico usando um corte do bloco dador corado com HE. Com a seringa extractora são retirados dos blocos dadores os cilindros de tecido seleccionados.

1.1.3 Construção do bloco receptor



Os tecidos extraídos são colocados em cada poço segundo um mapa previamente realizado. O bloco TMA completo é colocado na estufa a 37°C durante cerca de 30min.

ANEXO 1.2 MAPAS DOS TMA

I.2.1 Mapa dos TMA familiares

A0 MAMA FAMILIAR	3395/03-B2	11543/02	2640/03	1430/03	1702/03	10136/93
	8230/01	7661/96	1764/01	7661/96-B	10136/93	1702/03
	12065/00	2068/03-B	11160/99-B	1619/02	424419TU	115804
	41000/01	3371/99	12065/00	12065/00-B10	3395/03-B3	3371/99-B16

A1 MAMA FAMILIAR	4005/97A1(1)	4005/97-C1	4005/97-C2	4875/00T2(1)	4875/00(1)	4875/00(2)
	8735/98(1)	8735/98(2)	8735/98-B(1)	8735/98-B(2)	10866/97-NF3(1)	10866/97-NF3(2)
	10866/97-NF2	6052/01-27(1)	6052/01-27(2)	8735/98(1)	8735/98(2)	8603/99-01(1)
	8603/99-01(2)	10579/03-B2(1)	10579/03-B2(2)	6067/96(1)	6658/01-5(1)	6658/01-5(2)

A2 MAMA FAMILIAR	13289/03-B4(1)	6939/03 2	6939/03 4	606/98-B6(1)	606/98-B5	668/02-B
	668/02-B8	109/01-B10(1)	109/01-B1(1)	109/01-B9(1)	40746-B(1)	40746-G(1)
	366-B(1)	33726-A2(1)	33726-A(1)	33726-A*(1)	6793/97-B3(1)	6793/97-B4(1)
	6793/97-B5(1)	2495/02-B2(1)	2495/02-B6	6611/01-B7	7012/99-B(1)	7012/99-B*(1)

A3 MAMA FAMILIAR	13289/03B4(2)	606/98-B6(2)	109/01B10(2)	109/01B1(2)	109/01-B9(2)	40746-B(2)
	40746-G(2)	366-B(2)	33726-A2(2)	33726-A(2)	33726-A*(2)	6793/97B3(2)
	6793/97-B4(2)	6793/97B5(2)	2495/02B2(2)	7012/99-B(2)	7012/99-B*(2)	6611/01-B6
	7012/99-B*(3)	296/02-B6(1)	296/02-B6(2)	5543/01B2(1)	7905/03B2(1)	7905/03B2(2)

A4 MAMA FAMILIAR	241747	241747	411336	348102	411336	348102
	439831	439831	4358957	4588951	407888	34378
	407888	461579	411336	348102	411336	348102
	439831	439831	4383951	4588951	407888	34378

I.2.2 Mapa dos TMA esporádicos

A1 MAMA Esporádico	H98/2887	11231/00	1590/00	1991/00	6320/00	756/00
	8794/00	26 01	3762/01	1938/99	4509/99	7536/99
	8891/00	3624/00	3636/00	5228/99	10585/99	5695/99
	7726/99	4800/00	5530/00	9914/99	4875/00	2297/99

A2 MAMA Esporádico	1811/01	9134/00	4523/00	1689/99	9564/99	94/00
	2908/99	7380/00	5645/00	5040/00	8478/01	8421/01
	6810/01	8449/01	6648/01	6420/01	10630/01	10472/01
	10271/01	9518/01	7393/01	3340/02	3330/02	7745/00

A3 MAMA Esporádico	3257/01	3022/01	12407/00	8985/00	11618/00	3150/01
	9666/00	11474/00	8763/00	408/01	9490/99	7648/00
	2099/01 7	2099/01-B1	3182/01	3182/01-MF	5020/02	4640/02
	7914/02	H03/121	H03/637	H03/656	H03/675	H03/935-B1

A4 MAMA Esporádico	H03/935-B2	H03/1632	H03/1677	H03/1758	H03/1776	H03/1778
	H03/2064	H03/2609	H03/2787	H03/3343	H03/3466	H03/3497
	H03/3576	H03/3632	H03/3923	H03/3928	H03/1267	127/02-B23
	127/02-13	728/02	990/02	1729/02-10	1729/02-3	2004/02

A5 MAMA Esporádico	4065/02	4144/02	4152/02 6	4152/02 24	4615/02	5011/02
	5247/02	5810/02	7285/02	7368/02	7695/02	8616/02
	8704/02	9399/02	9598/02	9786/02	H2/10267-5	H2/10267-6
	10465/02	10775/02	10820/02	10870/02	11351/02	11571/02

A6 MAMA Esporádico	11584/02	H2/11591-B8	H2/11591-B6	11703/02	11847/02	12268/02
	12612/02	H03/1778	H03/2064	H03/2609	H03/2787	H03/3343
	H03/3466	H03/3497	H03/3576	H03/3632	H03/3923	H03/3928
	H03/1267	127/02-B23	127/02-13	728/02	990/02	1729/02-10

8.2. ANEXO 2

Protocolo otimizado e estabelecido pelo laboratório de Imuno-Histoquímica

TÉCNICA DE IMUNO-HISTOQUÍMICA (KIT LABVISION)

Caso as lâminas estejam protegidas com uma camada de parafina devem ser colocadas numa cuvete de vidro, imersas em *Clear-Rite* (agente desparafinizante, MICROM International) e posteriormente na estufa a 60°C. Após aproximadamente 30 minutos, deve-se proceder à desparafinação e hidratação dos cortes no aparelho Leica AautoStainer XL.

1. Recuperação Antigénica

Solução Retrieval

Diluir a solução retrieval (**Vector®**) 1/100 em água desionizada. Acertar o pH da solução a 6.00 (6.00-6.02). Pré-aquecer a solução em banho-maria a 98°C durante 5 minutos (numa cuvete de plástico). Colocar as lâminas durante 20 minutos (ou 30 conforme o anticorpo) na solução dentro do banho-maria e deixar arrefecer a solução à temperatura ambiente durante 5 minutos. Colocar as lâminas em PBS.

Solução de EDTA

Diluir a solução EDTA (Labvision) 1/100 em água destilada. Acertar o pH da solução a 8.00 (8.00-8.02). Pré-aquecer a solução em banho-maria a 98°C durante 5 minutos (numa cuvete de plástico). Colocar as lâminas durante 20 minutos na solução dentro do banho-maria e deixar arrefecer a solução à temperatura ambiente durante 5 minutos. Colocar as lâminas em PBS.

2. Bloqueio da Peroxidase Endógena

Para Bloqueio da peroxidase endógena coloca-se sobre a área delimitada (com caneta hidrofóbica) 100µl de solução de peróxido de hidrogénio a 3% diluído em metanol durante 10 minutos.

Lavagem em PBS 2x5 minutos (todas as lavagem podem ser feitas directamente na lâmina a fim de evitar demasiados movimentos dos *cores* do array).

3. Bloqueio de Reacções Inespecíficas

Incubação das lâminas com 100µl de UltraVisonBlock durante 15 minutos.

Após a incubação retirar o excesso de reagente escorrendo as lâminas e não lavar.

4. Anticorpo Primário

Incubação de 100µl anticorpo primário durante 30 minutos à temperatura ambiente ou *overnight* a 4°C.

Lavagem em PBS 2x5 minutos

5. Anticorpo Secundário Biotinilado

Incubação das lâminas com 100µl anticorpo secundário biotinilado anti-polivalente durante 15 minutos.

Lavagem em PBS 2x5 minutos

6. Complexo Streptavidina Peroxidase

Incubação das lâminas com 100µl do complexo streptavidina peroxidase durante 15 minutos.

Lavagem em PBS 2x5 minutos

7. Cromogénio: Diaminobenzidina (DAB)

Preparar uma solução de diaminobenzidina: 2 gotas de cromogénio DAB por cada mililitro de substrato. Incubar durante 6-7 minutos. Lavagem em água corrente durante 5 minutos.

8. Contraste Nuclear

Contrastar os núcleos com Hematoxilina de Mayer, mergulhando as lâminas neste corante durante 30 segundos. Lavagem em água corrente (ter o cuidado para que a água não caia directamente nas lâminas). A diferenciação é realizada por imersão repetida (cerca de 10 vezes) em água amoniacal 1%. Lavagem em água corrente. Após o contraste desidratam-se as lâminas numa série crescente de alcoóis (70%, 95% e absoluto).