

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Ciências

Gastroenterológicas

**Caracterização de um grupo de pacientes em risco para
Câncer de Mama e Cólon Hereditários quanto à
frequência da mutação 1100delC no gene *CHEK2***

Jamile Abud

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Prolla

Dissertação de Mestrado

2009

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Ciências Gastroenterológicas

**Caracterização de um grupo de pacientes em risco para
Câncer de Mama e Cólon Hereditários quanto à
frequência da mutação 1100delC no gene *CHEK2***

Jamile Abud

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Prolla

A apresentação desta dissertação é exigência do Programa de Pós-Graduação em Ciências Gastroenterológicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para a obtenção do título de Mestre.

Porto Alegre, Brasil

2009

FICHA CATALOGRÁFICA

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

XXXX Abud, Jamile

Caracterização de um grupo de pacientes em risco para Câncer de Mama e Cólon Hereditários quanto à frequência da mutação 1100delC no gene *CHEK2* / Jamile Abud; orient. João Carlos Prolla – Porto Alegre, 2009.

XXX f.: il.

Dissertação. (Mestrado), apresentada à Faculdade de Medicina de Porto Alegre da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Programa de Pós-Graduação em Ciências Gastroenterológicas.

Orientador: Prolla, João Carlos

Enquanto houver amizade

Pode ser que um dia deixemos de nos falar, mas, enquanto houver amizade,
faremos as pazes de novo.

Pode ser que um dia o tempo passe. Mas, se a amizade permanecer, um do outro
há de se lembrar.

Pode ser que um dia nos afastemos, mas, se formos amigos de verdade, a
amizade nos reaproximará.

Pode ser que um dia não mais existamos. Mas se ainda sobrar amizade,
nascemos de novo, um para o outro.

Pode ser que um dia tudo acabe. Mas com a amizade, construiremos tudo
novamente, cada vez de forma diferente, sendo único e inesquecível cada
momento que juntos viveremos e nos lembraremos para sempre.

(Albert Einstein)

À minha família, em especial ao meu amado,
fiel e companheiro pai; e
à todas as famílias incluídas neste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer a minha mãe Cloé K. Abud, e ao meu pai Antonio Carlos Abud, meus eternos companheiros e amigos, pelo exemplo de força que sempre foram para mim. Obrigada pelo amor, dedicação, carinho e apoio. Os meus sinceros agradecimentos por me ensinarem os verdadeiros valores de família e da vida como um todo.

Aos meus queridos irmãos pelo companheirismo, união, amor e força.

À Caroline Abud pelo exemplo de serenidade, segurança e determinação, obrigada pelo apoio e amizade em todas as horas. A Carime Abud, com quem aprendo todos os dias coisas que jamais encontraria na literatura, obrigada pela dedicação e carinho e pelas palavras de auto-confiança. Ao Alexandre Abud que mesmo longe, me ajudou muito com sua alegria e amor, tu és meu exemplo de superação. Amo vocês.

Aos meus cunhados João Homero Severiano, Tiago Drumond Fontoura e Cristiane pelos exemplos de caráter, honestidade, seriedade e dedicação, pelo sempre apoio nas etapas de minha vida.

Rafael Abud Severiano e Marcus Vinícius Abud Severiano. Meus amados sobrinhos, obrigada por preencherem minha vida de alegria e amor.

À minha amada Vó Nair, que sempre foi a luz em nossa família. Obrigada pela alegria, força e amor.

Aos pacientes incluídos neste estudo, agradeço pela disponibilidade e confiança. Agradeço principalmente pelos ensinamentos que tive com suas histórias de vida.

Ao Professor Dr. João Carlos Prolla, por todos os ensinamentos e pela sempre disponibilidade. Obrigada pelo carinho, pelo bom humor e confiança, atitudes tão importantes, que me fizeram acreditar em mim mesma.

À Professora Dra. Patrícia Ashton-Prolla, por ter me recebido no Laboratório de Medicina Genômica, pelos ensinamentos em Oncogenética, pela ajuda com as revisões, enfim, por ter me possibilitado a concretização do sonho da pós-graduação.

Não existem palavras que possam expressar o meu agradecimento ao Professor Dr. Galton de Campos Albuquerque. Meu maior incentivador desde a graduação, obrigada pelos conselhos no estudo, pela confiança que sempre tiveste em meu trabalho no laboratório do Hospital Mãe de Deus, por estar sempre me oportunizando crescimento e principalmente: muito obrigada pela amizade e carinho.

Ao Professor Dr. Elvino Barros e, à Dra Carolina Fishinger Moura agradeço pelo incentivo a leitura literária, pelos livros que muito me acompanharam na graduação, pela amizade e pelo carinho. Obrigada pelo incentivo ao ingresso na pós-graduação.

À maravilhosa equipe do Laboratório Amplicon, pelos ensinamentos de biologia molecular e pela amizade.

À Professora Dra. Luciane Nunes pelo bom humor e disponibilidade na ajuda com as análises estatísticas.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Medicina Genômica meu especial agradecimento:

Ao Carlos Eduardo Pitroski, Gabriel Macedo e Nelson, pela disponibilidade em ajudar, companheirismo e amizade.

À Karen Barbosa pela ajuda com as pacientes do Núcleo Mama Porto Alegre.

À Cristina Rossi pela ajuda com os heredogramas e pela amizade.

À Patrícia Izetti Ribeiro pela sempre disponibilidade, pela revisão dos critérios clínicos, pelas discussões dos projetos e seminários e pela companhia noturna no laboratório. Obrigada por tudo.

À Ernestina Aguiar pela amizade de longa data e pelo apoio.

À Juliana Giacomazzi pela ajuda com a revisão de câncer de mama, pela disponibilidade e amizade.

À Nicole e Liliane Todeschini pela amizade e agradável convivência.

À Edenir Inez Palmeiro pela ajuda com a padronização do PCR e pela amizade mesmo a distância.

À Ingrid Petroni Ewald e Liliana Cossio, estas pessoas únicas, obrigada pela amizade, pela ajuda em todo o trabalho. Ingrid, obrigada pelas palavras de motivação nos momentos mais difíceis. Liliana, obrigada pela revisão do meu trabalho, pela ajuda sempre, muito do que levo deste trabalho, aprendi contigo.

Agradeço imensamente a Professora Dra. Patrícia Koehler dos Santos, pela ajuda com a análise dos sequenciamentos, pelos ensinamentos, amizade e sempre disponibilidade em ajudar em tudo que precisei.

À Equipe do Serviço de Genética Médica, obrigada pela receptividade, amizade e disponibilização da estrutura para os seminários, coletas, utilização de computadores e impressão de artigos. Obrigada pela ajuda com as consultas no ambulatório de Oncogenética.

À Equipe de Docentes, Discentes e funcionárias do Programa de Pós-Graduação em Ciências Gastroenterológicas. Em especial agradeço à comissão do programa pela tão agradável convivência nestes dois anos.

Ao Centro de Pesquisas por possibilitar a realização deste trabalho, pela organização, responsabilidade e comprometimento com a pesquisa.

Aos amigos e colegas do Hospital Mãe de Deus, sem o apoio desta maravilhosa equipe de colegas e gestores este trabalho não teria sido iniciado. Ao Dr. Gastaldo pela flexibilização do meu horário de trabalho, às colegas Bioquímica Sabrina Nardino, Deiziane Araújo e Lívia pela compreensão e ajuda nas trocas de horários e cobertura no laboratório para que eu pudesse realizar os créditos acadêmicos obrigatórios. Ao Dr. José Miguel pela ajuda com o inglês, pela amizade e incentivo a nunca desistir. À Bioquímica Carolina Guedes, minha amiga, colega, gestora. Obrigada pelo sempre apoio em tudo em minha vida, obrigada pelo abraço nos momentos tristes e pelo sorriso nos momentos alegres. Obrigada pela compreensão e flexibilidade nos horários de trabalho. À Bioquímica Jeanine Oliva Barnasque, pelo exemplo de profissional e amiga, obrigada por todo

apoio e ensinamentos. À Bioquímica Jaqueline Angely Souza, pela amizade, apoio e incentivo incondicionais.

A Equipe do Serviço de Oncogenética do HCACC. À Dra. Maria Isabel pela meiguice, pela receptividade em São Paulo e pelo carinho que teve com os pacientes incluídos no estudo. À Enfermeira Amanda Nobrega, pela ajuda com o recrutamento dos pacientes, envio das amostras , disponibilidade e amizade.

Aos Geneticistas do INCA, Dr. Miguel Ângelo Moreira pela ajuda e dedicação com os sequenciamentos e Dr. Fernando Vargas pela ajuda com o recrutamento dos pacientes do Serviço de Oncogenética do INCA.

À todos que estiveram comigo e colaboraram para realização deste trabalho, muito obrigado.

ESTRUTURA

Após os itens INTRODUÇÃO, REVISÃO DA LITERATURA, JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS, esta dissertação apresenta um manuscrito redigido nos moldes do periódico a que foi submetido: *Cancer Letters*. Materiais e métodos, resultados e discussão encontram-se no artigo.

O item CONSIDERAÇÕES FINAIS contém interpretações e comentários gerais.

O item REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS refere-se somente às citações que aparecem na introdução e na revisão da literatura.

O item ANEXOS contém dados da pesquisa bibliográfica, protocolos, ficha de coleta de dados utilizados, documentos do projeto e heredogramas de todas as famílias incluídas no trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	XIV
LISTA DE TABELAS	XVI
LISTA DE FIGURAS	XVII
1. INTRODUÇÃO	19
2. REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1 Câncer de Mama	21
2.1.1 Epidemiologia do Câncer de Mama	21
2.1.2 Principais Fatores de Risco para Câncer de Mama	23
2.1.3 Câncer de Mama Hereditário	25
Síndrome de Predisposição Hereditária ao Câncer de Mama e	26
Ovário (HBOC)	
Síndrome de Li-Fraumeni (SLF)	27
2.2 Câncer Colorretal	30
2.2.1 Epidemiologia do Câncer Colorretal	30
2.2.2 Principais Fatores de Risco para Câncer Colorretal	31
2.2.3 Câncer Colorretal Hereditário	32
Síndrome de Lynch	33
2.3 Síndrome de Predisposição ao Câncer de Mama e Cólon	35
Hereditários (HBCC, do inglês: <i>Hereditary Breast and Colon Cancer</i>)	
2.3.1 Descrição e Riscos Associados	36
2.3.2 Diagnóstico Clínico	38
2.3.3 Diagnóstico Molecular	39
2.3.4 Aspectos Moleculares do Gene <i>CHEK2</i>	40
Estrutura e função do gene <i>CHEK2</i>	42
Mutações descritas no gene <i>CHEK2</i>	45
3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	47
3.1 Justificativa	47
3.2 Objetivos	47
3.2.1 Objetivo Principal	47
3.2.2 Objetivos Específicos	48
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	49
5. PRODUÇÃO CIENTÍFICA	60
5.1 Capítulo de livro: “Outras Síndromes Associadas ao Câncer de	59
Mama”. Manual Operativo do Instituto Nacional do Câncer (INCA) 2008	
5.2 Manuscrito: <i>CHEK2</i> 1100delC germline mutation : A prevalence	61
studyin Hereditary Breast and Colon Cancer (HBCC) in Brazilian	
families	
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	83
7. PERSPECTIVAS	86
8. ANEXOS	87

8.1 Anexos referidos na revisão bibliográfica	87
8.1.1 Critérios clínicos para Síndrome de Predisposição ao Câncer de Mama e Ovário: ASCO e NCCN	87
8.1.2 Modelo de probabilidade de mutação em <i>BRCA1</i> e <i>BRCA2</i> – Penn II	88
8.1.3 Tabelas de frequência de mutação do Laboratório Myriad	90
8.1.4 Critérios clínicos para a Síndrome de Li-Fraumeni: Clássicos, Birch, Eeles e Chompret	91
8.1.5 Modelo de probabilidade de mutação nos genes <i>MLH1</i> e <i>MSH2</i> – PREMM 1,2	92
8.1.6 Critérios clínicos para a Síndrome de Lynch: Amsterdam (I), Amsterdam (II), Bethesda e Bethesda Modificado	95
8.1.7 Critérios clínicos para a Síndrome de Predisposição Hereditária ao Câncer de Mama e Cólon de acordo com os seguintes autores: Abajo <i>et al.</i> , Meijers-Heijboer <i>et al.</i> , e Nasseem <i>et al.</i>	97
8.2 Protocolos e Documentos	99
8.2.1 Protocolo de extração de DNA	99
8.2.2 Protocolo da quantificação do DNA	101
8.2.3 <i>Primers</i> utilizados para o PCR de longo alcance	102
8.2.4 Protocolo do PCR de longo alcance	103
8.2.5 Protocolo de quantificação do PCR	107
8.2.6 Protocolo de sequenciamento dos Pcr(s)	108
8.2.7 Software utilizado para interpretação dos sequenciamentos	109
8.2.8 TCLE 07-076	111
8.2.9 Ficha Clínica	116
8.2.10 Heredogramas das famílias incluídas no estudo	119

LISTA DE ABREVIATURAS

ASCO	<i>American Society of Clinical Oncology</i>
APC	Gene envolvido na Polipose Familiar Adenomatosa
ATM	<i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i> (Ataxia telangiectasia Mutado)
AG	Aconselhamento Genético
BRCA1	<i>Breast Cancer Gene 1</i>
BRCA2	<i>Breast Cancer Gene 2</i>
CM	Câncer de mama
CMM	Câncer de mama masculino
CHEK2	Cell Cycle Checkpoint Kinase 2 (Checkpoint Quinase 2)
CCR	Câncer Colorretal
CP	Centro de Pesquisas Biológicas
DHPLC	<i>Denaturing High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografia Líquida Desnaturante de Alta Performance)
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
ER	<i>Estrogen receptor</i> (Receptor de Estrógeno)
FHA	<i>Domínio Fork head-associated</i>
FAP	<i>Familial Adenomatous Polyposis</i> (Polipose Familiar Adenomatosa)
HBCC	<i>Hereditary Breast and Colon Cancer</i> (Síndrome Hereditária de Predisposição ao Câncer de Mama e Cólon)
HBOC	<i>Hereditary Breast Ovarian Cancer</i> (Síndrome de Predisposição Hereditária ao Câncer de Mama e Ovário)
HNPCC	<i>Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer</i> (Câncer Colorretal Hereditário Não Polipomatoso)
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LMG	Laboratório de Medicina Genômica – Centro de Pesquisas Biológicas, HCPA
MMR	<i>Mismatch Repair</i> (Reparo de Pareamento Incorreto)
MLH1	Gene do sistema MMR
MSH2	Gene do sistema MMR
MSH6	Gene do sistema MMR
NCCN	<i>Nacional Comprehensive Cancer Network</i>
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
OR	<i>Odds Ratio</i>
PMS2	Gene do sistema MMR
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
SLF	Síndrome de Li-Fraumeni
SLFL	Síndrome de Li-Fraumeni símile

TP53
TCLE

Tumor Protein 53
Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Descrição na literatura de mutações em *CHEK2* encontradas em famílias SLF.
- Tabela 2** Mutações descritas no gene *CHEK2*: fenótipos e tumores relacionados.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Representação esquemática dos tipos de câncer de mama, com a contribuição de cada um dos tipos expressa em %.
- Figura 2** Evolução de pesquisa no gene *CHEK2*.
- Figura 3** Estrutura e ativação da proteína chek2 humana.
- Figura 4** Mecanismo de amplificação do sinal de alerta a danos no DNA promovido por *CHEK2*.

1. INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença gênica originada pelo acúmulo de mutações promovidas por um comportamento agressivo de crescimento de clones celulares. A grande maioria dos casos de câncer é causada por mutações somáticas. Entretanto, aproximadamente 1% dos tumores aparecem em indivíduos com uma clara síndrome hereditária ao câncer (Fearon, 1997).

O câncer afeta a todos (do jovem ao velho, do rico ao pobre, homens, mulheres e crianças) e representa uma grande aflição para pacientes, familiares e sociedades. Aproximadamente 40% de todos os tumores podem ser prevenidos. Outros podem ser detectados precocemente, tratados e curados (OMS, 2009).

No Brasil, as estimativas para o ano de 2008, válidas também para o ano de 2009, apontam que ocorrerão 466.730 casos novos de câncer. Espera-se que os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, sejam os cânceres de próstata e de pulmão, no sexo masculino, e os cânceres de mama e de colo do útero, no sexo feminino, acompanhando o mesmo perfil da magnitude observada no mundo (INCA, 2008).

O câncer de mama (CM) é o segundo tipo de tumor mais freqüente no mundo e o mais comum entre as mulheres. A cada ano, cerca de 22% dos casos novos de câncer em mulheres são de mama (INCA, 2008).

No que concerne à incidência, o câncer de cólon e reto (CCR) é a terceira forma mais comum de câncer no mundo, em ambos os sexos, e a segunda em países desenvolvidos (INCA, 2008).

A identificação adequada de pacientes com formas hereditárias de câncer de mama e cólon juntamente com a abordagem molecular para a detecção das

mutações associadas ainda são desafios no contexto do rastreamento e aconselhamento genético em todo mundo.

Embora não haja consenso sobre a real existência de uma síndrome de predisposição hereditária ao câncer de mama e cólon, essa entidade foi descrita em 2003 por Meijers-Heijboer e colaboradores (Meijers-Heijboer et al., 2003) e posteriormente relatada também por outros autores como síndrome HBCC (do inglês *Hereditary Breast and Colorectal Cancer*) (Lipton et al., 2002; Abajo et al., 2005; Naseem et al., 2006).

Em virtude das altas incidências destes tumores na população brasileira e da escassez de estudos sobre a síndrome HBCC, propomos como resultado deste trabalho oferecer a estas famílias um aconselhamento genético acompanhado do diagnóstico clínico através de rastreamento molecular confirmatório.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Câncer de Mama

O câncer de mama (CM) é no mundo todo, incluindo o Brasil, um problema de saúde pública, sendo a primeira causa de morte por câncer em mulheres. O CM, bem como outros tumores, é desenvolvido devido a uma desregulação da proliferação celular causada por mutações em determinados genes relacionados ao controle do ciclo celular. O acúmulo de mutações nas células tumorais causa instabilidade genômica (por exemplo, deleções, duplicações e/ou rearranjos gênicos) desencadeando o desenvolvimento do tumor. (Ferreira & Rocha 2006).

2.1.1 Epidemiologia do Câncer de Mama

O CM afeta uma de cada oito mulheres nos Estados Unidos. Mundialmente, o CM é o tumor mais freqüente em incidência e mortalidade no sexo feminino, correspondendo a 22% de todos os casos de câncer em mulheres, e 26% dos casos em países desenvolvidos, correspondendo a mais de duas vezes a ocorrência de câncer em mulheres comparado com a ocorrência de câncer em qualquer outro órgão (Tavassoli *et al.* 2003; Allain, 2008).

Em países desenvolvidos, tem havido um aumento persistente na incidência de CM, acompanhado da redução da mortalidade na faixa etária maior que 50 anos, provavelmente devido à garantia de acesso à saúde e à adoção de políticas de detecção precoce do tumor. (Firth & Hurst , 2005; Tavassoli *et al.* 2003). O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais freqüente no mundo e

o mais comum entre as mulheres. A cada ano, cerca de 22% dos casos novos de câncer em mulheres são de mama (INCA, 2008).

O número de casos novos de CM esperados para o Brasil, no ano de 2008 e 2009, é de 49.400 a cada ano, com uma incidência estimada de 51 casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2008). Segundo estimativas do INCA (Instituto Nacional do Câncer) para 2008 e 2009, na região Sudeste o CM é o mais incidente entre as mulheres, com uma estimativa de 68/100.000 novos casos. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o CM também é o mais freqüente nas mulheres das regiões Sul, Centro-Oeste e Nordeste com uma estimativa de 67/100.000, 38/100.000 e 28/100.000, respectivamente. Na região Norte, o CM é o segundo tumor mais incidente (16/100.000) (INCA, 2008).

O estado do Rio Grande do Sul (RS) aparece como o segundo estado com maior incidência da doença (85,5/100.000 mulheres). Em primeiro lugar, está o estado do Rio de Janeiro (92,77/100.000) e o terceiro estado mais incidente em CM é São Paulo (72,5/100.000) (INCA, 2008).

A mortalidade por CM é a mais alta de todas as neoplasias malignas na mulher, chegando a 15% nos EUA, com 40.410 mortes estimadas para 2007. Os dados da *American Cancer Society* mostram que houve um aumento da mortalidade entre 1983 e 1987, continuou o aumento, menos importante, entre 1987 e 2001, ficando estável entre 2001 e 2003, revelando pequena redução a partir dali (Silveira, 2008).

2.1.2. Principais Fatores de Risco para Câncer de Mama

O CM por ser uma doença com alta incidência no mundo, é uma importante questão de pesquisa, possuindo fatores de risco bem estabelecidos.

Existem tipos diferentes de fatores de risco para CM. Alguns fatores como idade ou etnia não podem ser modificados. Outros estão ligados a fatores ambientais e também existem fatores associados ao estilo de vida (tabagismo, consumo de álcool e dieta) (ACS, 2009).

Os principais fatores de risco para CM podem se dividir em: (a) Fatores de risco inatos para CM e (b) Fatores de risco para CM relacionados a hábitos e ambiente.

Fatores de Risco Inatos. O CM é mais freqüente em mulheres porque as células mamárias estão constantemente expostas a efeitos promotores de crescimento celular através dos hormônios femininos estrógenos e progesterona. A menarca em idade precoce (antes dos 11 anos de idade), a menopausa tardia (com mais de 54 anos de idade) e muitos ciclos ovulatórios (≥ 420) ininterruptos estão associados ao aumento no risco para CM. Mulheres com a menarca antes dos 11 anos de idade possuem um risco cerca de 20% maior de desenvolver CM ao longo da vida, em comparação com aquelas com mais de 14 anos de idade, isto pode ser explicado pelo maior tempo de exposição a hormônios (estrógenos e progesterona) (ACS, 2009; Pike *et al.*, 1981; Henderson *et al.*, 1985). Em relação ao câncer de mama masculino (CMM), esta é uma doença rara (aproximadamente 1% de todos os cânceres de mama), onde os principais fatores de risco são síndrome de Klinifelter, doenças associadas com altas doses de estrógenos, doenças testiculares e história familiar de CM (Wasielowski *et al.*, 2008).

Segundo a *American Cancer Society* (2009) uma mulher afetada por CM possui um risco três a quatro vezes maior de desenvolver um segundo tumor na outra mama, ou em outra região da mama já afetada. Quando analisamos a história familiar, um indivíduo com um parente em primeiro grau (mãe, irmã ou filha) afetado, possui um risco de desenvolver CM duas vezes maior do que o da população em geral, este risco aumenta consideravelmente se houver dois ou mais parentes em primeiro grau afetados. (ACS, 2009; Allain, 2008).

A etnia também é um fator importante a ser considerado. Estudos sugerem que mulheres judias, especialmente aquelas com história familiar em primeiro grau de CM, apresentam um risco quase quatro vezes maior de desenvolver a doença (Egan *et al.*, 1996).

Fatores de Risco Relacionados a Hábitos e Ambiente. Mulheres que não tiveram filhos ou que tiveram sua primeira gestação depois dos 30 anos de idade, possuem um risco maior para CM. Mulheres nulíparas apresentam risco igual àquelas em que o nascimento do primeiro filho foi entre os 25-29 anos de idade. O efeito protetor da gravidez pode estar relacionado com a diminuição do número de ciclos menstruais na mulher. O tempo de amamentação é importante, sendo a redução do risco, proporcional ao aumento do tempo de amamentação. O uso de contraceptivos orais está associado a um risco maior de desenvolver CM do que aquelas que nunca usaram, mas se viu que este risco pode cair uma vez que a mulher pare de administrar a pílula (*Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer 2002*, Harris *et al.* 1996; Offit *et al.* 1996; ACS, 2009).

Muitos estudos têm mostrado que o CM é menos comum em países onde a dieta típica é pobre em gorduras totais. Por outro lado, estudos comparando dieta

e risco para CM em diferentes países são complicados por sofrer interferência de fatores de confusão, como atividade física, ingestão de outros nutrientes e fatores genéticos, que podem também alterar o risco para CM (ACS, 2009). Além disso, a relação entre o CM e o alcoolismo também não está bem definida (Boffetta *et al.*, 2006).

2.1.3 Câncer de Mama Hereditário

Os tumores malignos da mama podem ser divididos genericamente em três formas: esporádicos, familiares e hereditários (Figura 1). Os tumores esporádicos correspondem à grande maioria dos casos e considera-se que sejam decorrentes de mutações somáticas predominantemente associadas à exposição a fatores de risco ambientais (Ward, 2002). Em sua grande maioria, são tumores que aparecem em mulheres com idade mais avançada (superior aos 50 anos de idade) e geralmente não há história familiar importante da doença. Os tumores descritos como familiares descrevem casos associados a algum outro diagnóstico de CM na família. Porém, geralmente não se evidencia um claro padrão de herança autossômica dominante, a idade ao diagnóstico dos casos não é precoce, e não se identificam mutações germinativas de predisposição ao CM; quando investigados, a ocorrência destes “agregados familiares” de CM está relacionada a uma combinação de fatores genéticos (mutações e/ou polimorfismos em genes de baixa penetrância) e ambientais (exposição ambiental, perfil reprodutivo e/ou social comum a diferentes membros de uma mesma família). Nestes casos a doença é aproximadamente duas vezes mais comum entre parentes de primeiro grau do que entre mulheres da população em geral (Pharoah *et al.*, 2008).

Estima-se que cerca de 10% de todos os casos de CM tenham etiologia hereditária. As duas principais síndromes de predisposição hereditária que envolvem CM são: Síndrome de Predisposição Hereditária ao Câncer de Mama e Ovário (HBOC, do inglês: *Hereditary Breast and Ovarian Cancer*) e Síndrome de Li-Fraumeni (SLF).

Figura 1. Representação esquemática dos tipos de câncer de mama, com a contribuição de cada um dos tipos expressa em %.(Modificado de ASCO).

Síndrome de Predisposição Hereditária ao Câncer de Mama e Ovário (HBOC)

A síndrome de HBOC está associada com um aumento significativo no risco para a ocorrência de tumores de mama e ovário quando comparado com o risco da população em geral. Esta síndrome é causada por mutações nos genes *BRCA1* (OMIM #113705), e *BRCA2* (OMIM #600185) (Allain, 2008). Mulheres com mutações germinativas nos genes *BRCA1* e/ou *BRCA2* possuem um risco ao longo da vida de 80% de desenvolver câncer de mama e de 20-60% de desenvolver câncer de ovário (Roukos e Briasoulis, 2007).

Critérios para o diagnóstico clínico foram desenvolvidos para HBOC em vários países e geralmente incluem características específicas da síndrome. Os principais critérios utilizados para diagnóstico clínico são os critérios do NCCN (do inglês *National Comprehensive Cancer Network*) (<http://www.nccn.org>) e da ASCO (do inglês *Statement of the American Society of Clinical Oncology*) (<http://www.asco.org>) (item 8.1.1).

Além dos critérios para diagnóstico clínico é possível utilizar modelos de estimativa da probabilidade de existir uma mutação nos genes *BRCA1/2* num indivíduo a partir da história familiar de câncer. Os principais modelos existentes atualmente são os modelos de Couch modificado (Penn II) (8.1.2) e as tabelas de prevalência de mutação do laboratório Myriad (Frank et al., 2002, <http://acgh.afcri.upenn.edu>, <http://www.myriad.com>) (8.1.3). Os critérios utilizados para indicar o teste genético para identificação de mutações nos genes *BRCA1/2* variam em diferentes países, mas uma probabilidade mínima de mutação de 10% deve ser considerada (Antoniou *et al*, 2003).

Síndrome de Li-Fraumeni (SLF)

A síndrome de Li-Fraumeni (OMIM#151623) é uma síndrome rara de predisposição ao câncer com padrão de herança autossômica dominante, caracterizada pelo desenvolvimento de vários tipos de tumores em idade precoce.

Estima-se que pacientes com esta síndrome apresentam 50% de chance de desenvolver tumores antes dos 30 anos de idade, comparados a 1% na população em geral e que 90% desenvolverão câncer até os 70 anos de idade. Acredita-se que 1% dos casos de CM sejam explicados por esta síndrome (Gonzalez *et al.*, 2009; Ferreira & Rocha 2004; Allain 2008). A SLF está associada à mutações germinativas no gene supressor de tumor *TP53* (17p13, OMIM#191170). Cerca de 70% e 40% dos casos de SLF e síndrome de Li-Fraumeni-Like (SLFL), respectivamente, possuem mutações neste gene. O gene *TP53* codifica um fator de transcrição, chamado p53, que está envolvido em várias vias de sinalização intracelular associadas ao controle da proliferação celular e integridade genômica. Mutações germinativas em *CHEK2* (cromossomo 22q12.1, OMIM#604373) tem sido atribuídas a muitas famílias com SLF clássico e SLFL (Tabela 1). Em 1999, Bell e colaboradores identificaram em famílias SLF e SLFL cinco mutações no gene *CHEK2*, entre estas a 1100delC. Recentemente Ruijs e colaboradores analisaram o gene *CHEK2* em 65 pacientes com fenótipo SLF e sem mutações em *TP53*. A mutação 1100delC foi encontrada numa frequência de 6,2% (4/65), valor estatisticamente significativo quando comparado com 150 controles (p=0,006) (Dawn 2008; Ruijs *et al.*, 2009; Palmero *et al.*, 2008; Achatz *et al.*, 2007; Bell *et al.*, 1999).

Tabela 1. Descrição na literatura de mutações em *CHEK2* encontradas em famílias SLF (modificada de Ruijs *et al.*, 2009).

Autores	Número de famílias testadas: LFS/LFL e sugestivo	Total de análises em Chek2	Mutações encontradas
Allinen <i>et al</i> (2001)	1/20/0	21	p.Ile157Thr
Bell <i>et al</i> (1999)	4/18*	22	c.1100delC p.Ile 157Thr
Bourgard <i>et al</i> (2001)	0/4/0	4	-
Lee <i>et al</i> (2001)	10/49*	59	p.Arg145Trp p.Arg3Trp p.Ile157Thr
Siddiqui <i>et al</i> (2005)	1/13/1	0	-
Sodha <i>et al</i> (2002)	5/21/0	26	IVS5-II G>A c.483-485delAGA
Vahteristo <i>et al</i> (2001)	1/6/32	39	1100delC
Walsh <i>et al</i> (2006)	3/7/0	10	-
Ruijs <i>et al</i> (2009)	1/35/29	34	p.Phe328Ser c.1100delC c.1081- 1771+?del

LFL sugestivo inclui sarcoma na infância ou tumor no sistema nervoso central ou pelo menos dois tumores primários ou a ocorrência de dois parentes em primeiro grau com câncer ou ainda câncer de mama antes dos 30 anos de idade; *LFL e LFS – sugestivo combinados, subdivisão não foi mencionada; LFL se refere aos critérios Birch e Eeles.

O diagnóstico clínico da SLF se dá através do preenchimento de critérios específicos denominados critérios clássicos. Famílias com características incompletas para SLF são referidas como SLFL, e para tal foram propostos alguns critérios clínicos: SLFL- Birch, SLFL- Eeles1, SLFL-Eeles2. Mais recentemente, Chompret e colaboradores em 2001 recomendaram que o teste genético para mutações em *TP53* deveria ser considerado em famílias com critérios ainda mais estritos. Os critérios citados acima para SLF e SLFL estão descritos no item 8.1.4 (Allain, 2008; Achatz *et al.*, 2007; Gonzalez *et al.*, 2009).

Quando associamos o fenótipo SLF com a prevalência de mutações em *TP53*, vemos que em famílias que não preenchem critérios estritos para SLF, a

chance de identificar mutações germinativas em *TP53* é muito baixa. Especificamente, usando os critérios para SLF-L descritos por Birch a taxa de detecção da mutação estimada é de 21-40%, usando aqueles descritos por Eeles, é de 8%. Usando os critérios de Chompret e colaboradores, mutações em *TP53* seriam identificadas em 20% dos casos (Allain 2008).

2.2 Câncer Colorretal

No que concerne à incidência, o câncer de cólon e reto é a terceira causa mais comum de câncer no mundo, em ambos os sexos, e a segunda causa em países desenvolvidos. Os padrões geográficos são bem similares entre homens e mulheres, porém, a incidência de câncer de reto é cerca de 20% a 50% maior em homens na maioria das populações. A sobrevida para este tipo de neoplasia é considerada boa, se a doença for diagnosticada em estágio inicial. A sobrevida média global em cinco anos varia entre 40% e 50%, não sendo observadas grandes diferenças entre países desenvolvidos e em desenvolvimento. Esse relativo bom prognóstico faz com que o câncer de cólon e reto seja o segundo tipo de câncer mais prevalente em todo o mundo, com aproximadamente 2,4 milhões de pessoas vivas diagnosticadas com essa neoplasia (INCA, 2008).

2.2.1 Epidemiologia do Câncer Colorretal

O número de casos novos de câncer de cólon e reto estimado para o Brasil, no ano de 2008 (também válidos para 2009), é de 12.490 casos em homens e de 14.500 em mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 13 casos novos a cada 100 mil homens e de 15 para cada 100 mil mulheres. Sem

considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer de cólon e reto em homens é o terceiro mais freqüente na região Sudeste (19/100.000) e quarto na região Sul (21/100.000). Para as mulheres, é o segundo mais freqüente na região Sudeste (21/100.000), o terceiro mais freqüente na região Sul (22/100.000)(INCA, 2008).

2.2.2 Principais Fatores de Risco para Câncer Colorretal

Em geral, 90% dos casos de CCR são diagnosticados após os 50 anos de idade e o risco de desenvolver CCR aumenta com a idade. De acordo com a *American Cancer Society*, os fatores de risco para CCR serão descritos quanto à:

Dieta e Estilo de Vida, Fatores Modificadores. A alta incidência de carcinomas colorretais é observada em populações onde a dieta é rica em calorias e rica em gordura animal, associada ao sedentarismo. Estudos epidemiológicos têm indicado que o consumo de carne, fumo e álcool são fatores de risco. Associações inversas incluem consumo de vegetais, uso prolongado de anti-inflamatórios não-esteróides e terapia de reposição hormonal. Uma rara, mas bem reconhecida etiologia do CCR é a terapia de irradiação pélvica (Hamilton *et al.*,2000; Offit, 1998)

Inflamação Crônica. Doenças inflamatórias intestinais crônicas são fatores etiológicos importantes no desenvolvimento de adenomas colorretais. A colite ulcerativa é uma doença crônica com etiologia desconhecida que afeta crianças e adultos. Estudos populacionais mostram que as doenças inflamatórias estão associadas a um risco de 4,4 vezes maior de mortalidade por carcinoma colorretal. Em estudos clínicos este risco aumenta para 20 vezes. A doença de Crohn

também está associada ao desenvolvimento de carcinomas, o risco é três vezes maior do que na população em geral (Hamilton *et al.*,2000; Offit, 1998).

2.2.3 Câncer Colorretal Hereditário

O CCR é uma doença que atinge indistintamente tanto homens quanto mulheres e geralmente apresenta três padrões distintos: esporádico, hereditário e familiar. A forma esporádica da doença representa cerca de 70% dos casos de CCR e é comum em pessoas com mais de 50 anos. Estes casos são geralmente causados por fatores ambientais ou pelos efeitos da idade. O CCR hereditário (aproximadamente 5% de todos os casos) é causado por mutações em genes de alta penetrância que causam síndromes hereditárias onde a maioria são transmitidas de uma maneira autossômica dominante, como por exemplo, a síndrome de Lynch. A etiologia do CCR nestes casos é devida a uma combinação de fatores genéticos e ambientais, mas os fatores genéticos têm um papel dominante. Cerca de 20% de todos os casos são categorizados como familiares e estão associados a mutações em genes de baixa penetrância; aparecem em uma frequência alta o suficiente para não serem considerados CCR esporádico, mas não seguem o padrão de herança das síndromes hereditárias. (Ferreira & Rocha 2004; Abdel-Rahman *et al.*, 2008; Vasen 2005). A síndrome hereditária mais comum associada ao CCR é a Síndrome de Lynch.

Síndrome de Lynch

A síndrome de Lynch, também conhecida como Câncer Colorretal Hereditário Não Polipomatoso (HNPCC, do inglês *Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer*, OMIM#120435) se caracteriza pelo desenvolvimento de CCR, câncer de endométrio e vários outros tumores em pacientes com idade jovem (aproximadamente 45 anos de idade). Trata-se de uma doença com padrão de herança autossômica dominante, na qual é possível identificar indivíduos afetados por câncer (principalmente CCR) em mais da metade da família nas sucessivas gerações (Vasen, 2005; Robinson *et al.*, 2007; Arnold *et al.*, 2005; de la Chapelle, 2004; Abdel-Rahman *et al.*, 2008).

A síndrome de Lynch é causada por mutações germinativas nos principais genes do sistema MMR (do inglês *Mismatch Repair*) de reparo do DNA (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6* e *PMS2*), com uma penetrância de aproximadamente 80% para CCR, 60% para câncer de endométrio e até 20% para os outros tipos de tumores. Mutações nestes genes causam instabilidade genômica em seqüências curtas repetidas do genoma (chamadas microssatélites) e o efeito cumulativo destas alterações, nos genes relacionados ao controle do ciclo celular levam ao desenvolvimento do tumor (Vasen, 2005; Arnold *et al.*, 2005; de la Chapelle, 2004; Hadley *et al.*, 2008; Shia, 2008; Baudhuin *et al.*, 2005; Watson *et al.*, 2005; Nagorni, 2002; Abdel-Rahman *et al.*, 2008; Balaguer *et al.*, 2007). Podemos estimar a chance de um indivíduo ser portador de uma mutação em *MLH1* e em *MSH2* através de um modelo clínico de predição de risco, chamado PREMM 1,2 (<http://www.dana-farber.org>) (item 8.1.5).

Nos primeiros estudos sobre a síndrome de Lynch que tiveram como objetivo a definição das características clínicas da síndrome, o Grupo Internacional Colaborativo de HNPCC, atualmente chamado Sociedade Internacional de Tumores Gastrointestinais Hereditários (InSiGHT, *International Society of Gastrointestinal Hereditary Tumors*) propôs uma série de critérios clínicos para a síndrome de Lynch em 1990, chamados Critérios de Amsterdã. Alguns investigadores notaram que algumas famílias clássicas estavam sendo excluídas por apresentarem tumores extracolônicos não incluídos nos critérios clínicos inicialmente propostos. A fim de solucionar esses problemas, em 1999 o InSiGHT propôs uma nova série de critérios (critérios de Amsterdã Modificados, ou critérios de Amsterdã II, descritos no item 8.1.6), incluindo tumores extracolônicos associados à síndrome de Lynch (Vasen, 2005).

Os critérios de Amsterdã modificados reconheceram a importância dos tumores extracolônicos para o diagnóstico da síndrome. Porém, esses critérios poderiam ser pouco sensíveis em casos onde a família é pequena ou a história familiar não é conhecida. Para o auxílio no diagnóstico de casos como estes, portanto, foram propostas os Critérios de Bethesda (item 8.1.6), em 1996 (Boland *et al.*, 1998). Estes critérios descrevem, praticamente, todas as condições clínicas suspeitas da síndrome de Lynch (Vasen, 2005; Umar *et al.*, 2004). Nos pacientes com diagnóstico de síndrome de Lynch, o risco de desenvolver câncer ao longo da vida é dependente do sexo e do gene afetado. O risco de desenvolver CCR em pacientes com mutação em genes MMR varia de 30-85%, o risco de desenvolver câncer de endométrio varia de 30-60%, e o risco de desenvolver outros tipos de

tumores do espectro Lynch é menor que 10% (Vasen, 2005; Lu *et al.*, 2007; Lu *et al.*, 2005).

Um estudo recente na Holanda encontrou a mutação 1100delC no gene *CHEK2* em 10 de 237 pacientes (4,2%) selecionados pelos critérios HNPCC, quando comparado com 1% encontrado no grupo controle, conferindo risco para CCR (Wasielewski *et al.*, 2008).

2.3 Síndrome de Predisposição ao Câncer de Mama e Cólon Hereditários (HBCC, do inglês: *Hereditary Breast and Colon Cancer*)

A proposta do fenótipo HBCC (OMIM#604373), caracterizando uma síndrome hereditária de predisposição ao CM e CCR, teve início em 2003 quando Meijers-Heijboer e colaboradores notaram que em muitas famílias com CM e portadoras da mutação 1100delC no gene *CHEK2* também existiam casos de CCR. Os autores selecionaram pacientes com CCR (classificados como HNPCC, HNPCC Like e FAP, do inglês *Familial Adenomatous Polyposis*) Neste estudo também foram incluídos indivíduos com pelo menos dois casos de CM parentes em primeiro ou segundo grau, sendo um deles diagnosticado antes dos 60 anos de idade. Aqueles casos onde não foram encontradas mutações nos genes *APC*, *MLH1*, *MSH2* ou *MSH6*, foram testados para a mutação 1100delC no gene *CHEK2*. Neste estudo, foi verificado que a mutação de interesse no gene *CHEK2* estava presente em 18,2% (10/55) das famílias com fenótipo HBCC segundo os critérios dos autores (item 8.1.7) e em 4% (15/380) das famílias sem estes critérios (OR 5,41; 95% IC 2,29-12,8; P<0,001) (Meijers-Heijboer *et al.*, 2003).

2.3.1 Descrição e Riscos Associados

A maioria dos relatos que associa a síndrome HBCC ao gene *CHEK2* descreve uma deleção de uma citosina na posição 1100 no éxon 10. A mutação 1100delC em *CHEK2* é uma mutação “frameshift” que resulta em um códon de parada prematuro (*Stop Codon*). Esta mutação pode estar associada com um risco elevado para CM e provavelmente com o fenótipo HBCC ou ainda com uma susceptibilidade para outros tumores (Allain, 2008; Ruijs *et al.*,2008). Atualmente existem poucos relatos disponíveis na literatura relacionados à síndrome HBCC. Em um estudo realizado na Espanha em 2005, onde foram analisadas 34 famílias com critérios clínicos para HBCC, Abajo e colaboradores não encontraram a mutação 1100delC no gene *CHEK2* nos indivíduos analisados. As análises não foram restritas aos casos índices, mas todos os membros afetados e parentes em primeiro grau dos mesmos, disponíveis de cada família foram testados (Abajo *et al.*,2005).

Em 2006, em um estudo realizado na Suécia, foram selecionadas mulheres afetadas com CM e CCR através de uma análise retrospectiva. Neste estudo foram incluídos 64 pacientes com CM como primeiro tumor, 25 pacientes com CCR como primeiro tumor e 7 pacientes com tumores de mama e cólon sincrônicos. Ao total, foram analisados 75 pacientes e a mutação 1100delC foi encontrada em dois casos (2,5%), mas não houve diferença significativa quando comparado ao grupo controle ($p=0,26$) (Isinger *et al.*,2006).

Neste mesmo ano, em 2006, Nasseem e colaboradores avaliaram a associação entre CM e CCR em famílias de Manchester (Inglaterra) selecionadas a partir de uma análise retrospectiva de casos referidos com CM e/ou CCR. Neste

estudo foram selecionadas 8612 famílias com suspeita de CM ou CCR familiar: 1631 famílias com CCR e 6981 famílias com CM como primeiro tumor. Das 8612 famílias selecionadas, 184 preenchem critérios para HBCC (anexo 7), sendo 68 famílias com casos de CM e 116 famílias com CCR. Em apenas 113 casos (provenientes de 83 famílias) foi possível analisar a mutação 1100delC do gene *CHEK2*. Dos 113 casos analisados, apenas um indivíduo apresentou a mutação em questão, correspondendo a uma frequência de 1%. Os autores mencionam que seus resultados não suportam um fenótipo para HBCC separado de genes de alto risco já conhecidos (*BRCA1/2* e genes *MMR*) (Nasseem *et al.*, 2006).

Em um estudo realizado na Dinamarca por Weisher e colaboradores a mutação 1100delC no gene *CHEK2*, foi encontrado um OR de 3,2 (95% IC 1,0 a 9,9) para CM e 1,6 (95% IC 0,4 a 6,5) para CCR (Weisher *et al.* 2007).

A prevalência da mutação 1100delC no gene *CHEK2* entre mulheres com ou sem CM varia entres os países (Mellemkjaer *et al.*, 2008). A mutação 1100delC quando analisada em associação ao CM parece ser mais prevalente em holandeses (4% de pacientes com diagnóstico precoce de CM), e rara na Austrália, Espanha e em judeus Ashkenazi. Está presente em 1% dos pacientes com CM não selecionados para história familiar na Polônia e foi originalmente relatada em múltiplas famílias da República Tcheca (Narod *et al.*, 2006).

Um estudo realizado com 507 pacientes com CM familiar, encontrou a mutação 1100delC no gene *CHEK2* em 28 casos (5,5%), uma frequência alta quando comparado com o grupo controle (OR 4,18, 95% IC 2,4 – 7,2; p=0,0002) (Vahteristo *et al.*, 2002).

Na Holanda, Schmidt e colaboradores, realizaram um estudo de coorte no qual pesquisaram a mutação 1100delC no gene *CHEK2* em 1479 mulheres que foram tratadas devido ao diagnóstico de câncer de mama invasivo antes dos 50 anos de idade; as pacientes incluídas foram acompanhadas por uma média de 10 anos. A mutação germinativa 1100delC no gene *CHEK2* foi identificada em 54 pacientes (3,7%). Portadoras da mutação tiveram um risco duas vezes maior de desenvolver um segundo câncer de mama (OR ajustado para idade, 2.1; IC, 1.0 a 4.3; $P = 0.049$) e tiveram pior sobrevida livre de recorrência (HR, 1.7; IC, 1.2 a 2.4; $P = 0.006$) (Schmidt *et al.*, 2006).

Em 2007, um estudo realizado em Estocolmo (Suécia) por Margolin e colaboradores encontrou uma associação entre pacientes com CM familiar (mínimo de dois casos de CM em parentes em primeiro grau) e a presença da mutação germinativa 1100delC do gene *CHEK2* (2.2% *versus* 0.7% em controles, $p=0.03$), o que confirma resultados prévios de que a variante analisada confere um risco para CM (Margolin *et al.*, 2007).

Através de uma metanálise, Weisher e colaboradores em 2008 concluíram que a mutação 1100delC no gene *CHEK2* é uma mutação claramente associada a um risco 3-5 vezes maior para o desenvolvimento de câncer de mama (Weisher *et al.*, 2008).

2.3.2 Diagnóstico Clínico

Não há um protocolo estabelecido no aconselhamento genético das famílias com diagnóstico fenotípico HBCC. (Lipton *et al.*, 2002). O diagnóstico clínico da síndrome HBCC é feito através da análise do heredograma e segue critérios

clínicos específicos (Meijers-Heijboer *et al.*, 2003) contemplados com a história familiar de tumores confirmada por laudos anátomo-patológicos.

Um estudo realizado por um grupo da Polônia em 2008, analisou o DNA de 4441 mulheres com CM diagnosticado antes dos 50 anos, procurando a presença de três mutações descritas no gene *CHEK2*: 1100delC, IVS + 1G>A e del5395. O objetivo do estudo foi verificar a associação entre a presença de alelos mutantes no gene *CHEK2* e pacientes com CM receptor de estrógeno positivo (ER, do inglês: Estrogen Receptor). Os resultados confirmam que casos de CM (s) associados a mutações no gene *CHEK2* são predominantemente ER positivos. Neste mesmo estudo é sugerido o uso de tamoxifeno como possível tratamento preventivo para portadores de mutações no gene *CHEK2*, já que o tamoxifeno pode ser também efetivo na supressão de CM recorrentes em portadores destas alterações gênicas, pois espera-se que a maioria destes tumores sejam ER positivos.

2.3.3 Diagnóstico Molecular

O diagnóstico molecular para indivíduos com fenótipos clínicos da síndrome HBCC é iniciado através do rastreamento da mutação 1100delC, embora sua frequência na população brasileira não tenha ainda sido definida. Para evitar amplificação de pseudogenes a técnica preferida para identificação da mutação no éxon 10 é PCR de longo alcance seguido de sequenciamento, embora também possam ser usadas técnicas como DHPLC (do inglês *Denaturing High Performance Liquid Chromatography*) seguido de sequenciamento confirmatório (Sodha *et al.*,2002). Se o resultado da investigação inicial for negativo, pode-se investigar mutações no restante da sequência codificadora de *CHEK2* já que

outras variantes alélicas foram descritas em associação com câncer (p.ex. IVS2+1G-A, I157T, S428F) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Pelo fato de não haver o reconhecimento desta síndrome, famílias com história significativa de casos de CM e CCR, devem ser analisadas para outras síndromes clínicas envolvendo estes tumores (por exemplo, SLF, Síndrome de Lynch e HBOC) e posteriormente, de acordo com o aconselhamento genético, investigadas para mutações já descritas nos genes conhecidamente envolvidos nas mesmas.

2.3.4 Aspectos Moleculares do Gene *CHEK2*

CHEK2 é um gene importante envolvido no reparo do DNA, portanto, alterações neste gene estão associadas à predisposição ao câncer (Offit *et al.*, 2008). *CHEK2* foi primeiramente identificado em *S. cerevisiae* como Rad53 e pouco tempo depois em *S. pombe* como Cds1. Estes primeiros estudos revelaram que Rad53 e Cds1 são serinas/treoninas quinases que monitoram a replicação do DNA e ativação da parada do ciclo celular em resposta a danos ao DNA. Em 2002 a mutação 1100delC em *CHEK2* foi sugerida como um alelo de baixa penetrância a susceptibilidade a CM em indivíduos não portadores de mutações em *BRCA1/2*. (Antoni *et al.*, 2007)

A figura 2 resume o histórico da descoberta do gene *CHEK2* e a sua associação com o câncer.

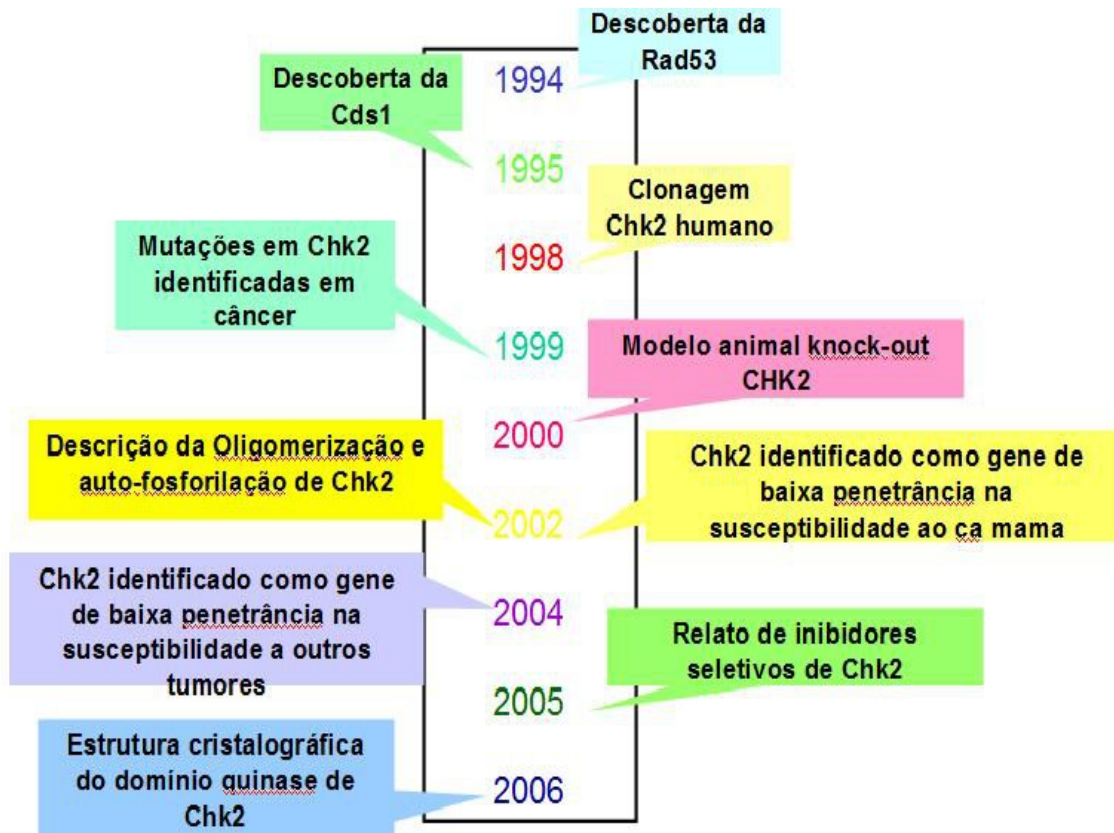


Figura 2. Evolução de pesquisa no gene *CHEK2* (Modificado de Antoni *et al.*,2007).

Estrutura e função do gene *CHEK2*

O gene *CHEK2* (também conhecido como *CHK2*, OMIM#604373) está localizado no braço longo do cromossomo 22 na posição 22q12.1. É um gene supressor de tumor, mediador de resposta a danos ao DNA. O produto protéico do gene *CHEK2* é ativado através da fosforilação por ATM (OMIM#208900) em resposta a danos na dupla-fita do DNA. O gene *CHEK2* codifica uma proteína quinase (ortóloga à *Cds1* de *Schizosaccharomyces pombe* e à *Rad53* de *Saccharomyces cerevisiae*), *chk2*, que está envolvida no controle dos pontos de checagem na fase de G1 do ciclo celular. Após ser ativada, *chk2* atua no controle do ciclo celular e no reparo de danos no DNA através de sua atividade de fosforilação de proteínas importantes, como p53 (OMIM#191170), Cdc25C (OMIM#157680), Cdc25A (OMIM#116947) e BRCA1 (OMIM#113705), que promovem a parada no ciclo celular, apoptose ou ativação dos mecanismos de reparo (Schutte *et al.*, 2003; Antoni *et al.*, 2007; The *CHEK2* breast cancer consortium, 2002; The *CHEK2* breast cancer case-control consortium, 2004)

O gene humano *CHEK2* tem um tamanho aproximado de 50 Kb e possui 16 éxons (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). O produto protéico deste gene pode ser dividido em três domínios: Domínio N-terminal SQ/TQ (1), domínio FHA (2) e um domínio serina/treonina quinase (3) (Nevanlinna & Bartek, 2006). A figura 3 representa de maneira esquemática a estrutura da proteína.

1) Domínio N-terminal SQ/TQ: é um domínio regulatório que contém sete serinas ou treoninas residuais seguidos de glutamina (SQ ou TQ) este domínio é fosforilado por ATM, e esta fosforilação ativa *chk2* em resposta a radiações ou

agentes genotóxicos que podem causar dano na dupla-fita do DNA (Nevanlinna & Bartek , 2006)

2) Domínio *Fork head-associated* (FHA): está envolvido em ligações com outras proteínas fosforiladas, particularmente através do reconhecimento de resíduos de fosfo-treoninas. Este domínio participa na dinâmica de interação fosfoproteína-proteína de chek2 durante a ativação e sinalização de danos ao DNA (Nevanlinna & Bartek , 2006).

3) Domínio serina/treonina quinase: este domínio, quinase catalítico, ocupa a região carboxi-terminal de chek2 (Nevanlinna & Bartek , 2006).

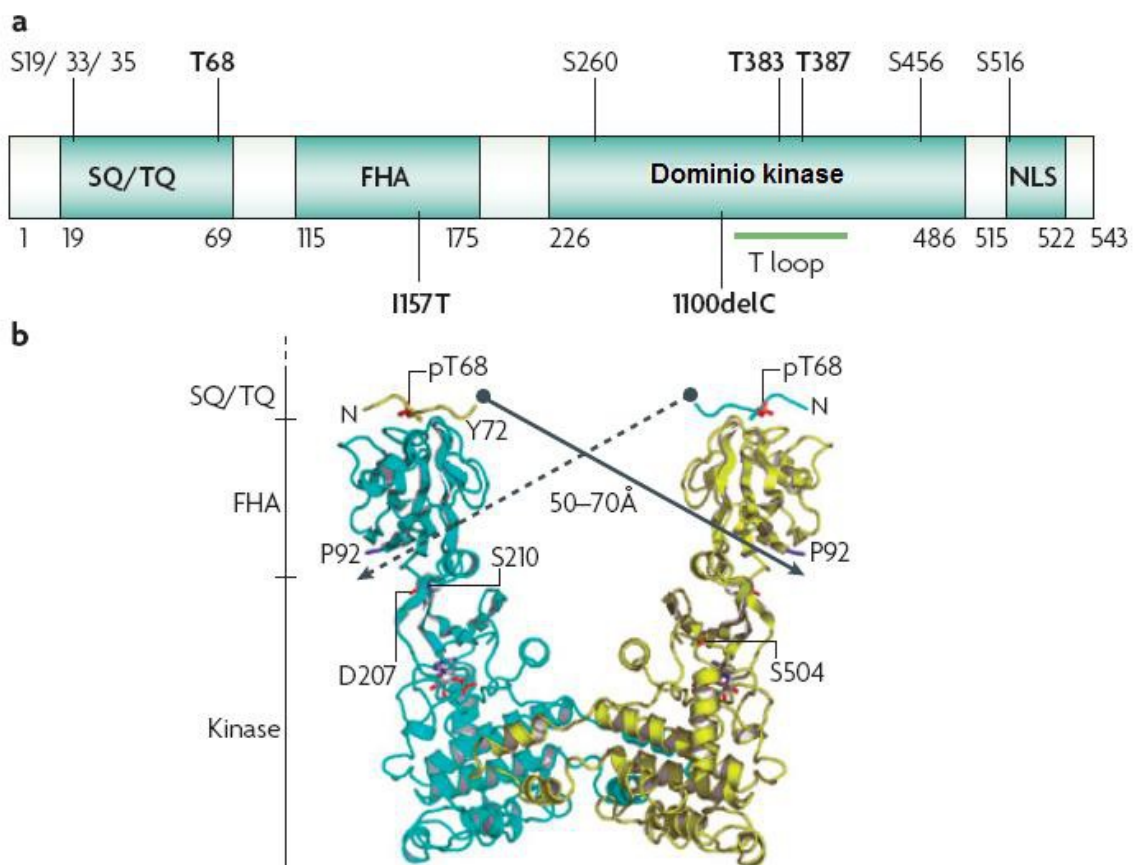


Figura 3. Estrutura e ativação da proteína chek2 humana. **a)** domínios (1) SQ/TQ, (2) FHA e o (3) domínio catalítico quinase. NLS: sinal de localização nuclear (do

inglês: *Nuclear Localization Signal*). **b)** Modelo esquemático ampliado do dímero chek2. (Modificado de Antoni *et al.*, 2007).

A ativação do domínio quinase de chek2 em resposta a danos ao DNA é um processo dinâmico e composto de múltiplos passos (figura 4). Inicia-se por uma rápida fosforilação realizada por ATM em muitos sítios de SQ/TQ, na região regulatória N-terminal de chek2 o que promove uma homodimerização e intermolecular fosforilação de chek2. Pelo menos no início, a fosforilação de chek2, mediada por ATM, ocorre exclusivamente por danos no DNA. Após a sua ativação, chek2 rapidamente se move através do nucleoplasma para difundir uma cascata de sinalização intracelular de resposta a danos no DNA (Nevanlinna & Bartek, 2006; Antoni *et al.*, 2007).

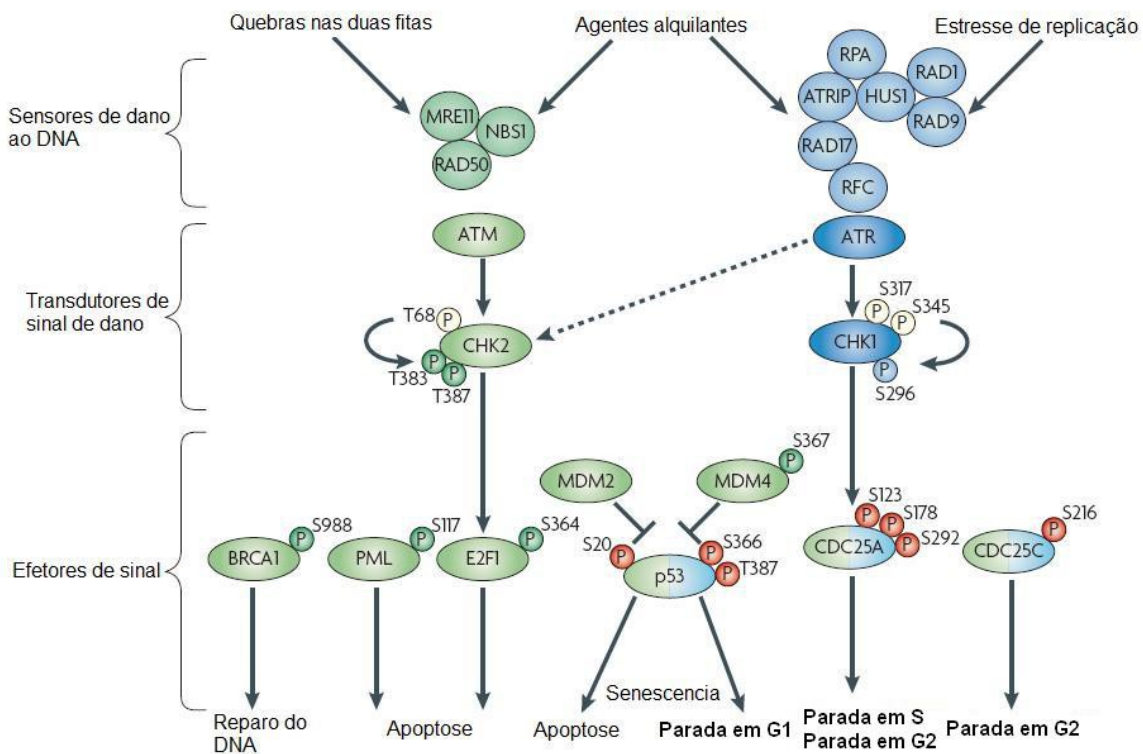


Figura 4. Mecanismo de amplificação do sinal de alerta a danos no DNA promovido por *CHEK2*. Inicialmente o complexo de proteínas sinalizadoras, MRN (composto por MRE11, NBS1 e RAD50) é requerido para ativar ATM, o qual irá fosforilar *CHEK2*. Os substratos simbolizados por compartilhar as cores verde e azul estão envolvidos nas vias de *CHEK1* e *CHEK2*. (Modificado e traduzido de Antoni *et al.*, 2007).

Mutações descritas no gene *CHEK2*

Mutações no gene *CHEK2* foram inicialmente descritas por Bell e colaboradores em 1999 a partir de um estudo de pacientes com fenótipo SLF (Bell *et al.*, 1999). Na tabela 2 estão descritas as mutações encontradas em *CHEK2*.

Tabela 2. Mutações descritas no gene *CHEK2*: fenótipos e tumores relacionados.

Autores	Síndromes, Tumores Relacionados	Mutações
Bell et al. (1999) Vahteristo et al. (2001, 2002) Meijers-Heijboer et al. (2002,2003) Dong et al. (2003) CHEK2 Breast Cancer Case-Control Consortium (2004) Bock et al. (2004) Johnson et al. (2005) Cybulski et al. (2006)	SLF, HBCC CM, CCR, Próstata	1-BP DEL, 1100C
Bell et al. (1999) Dong et al. (2003) Kilpivaara et al. (2004, 2006) Cybulski et al. (2004,2006)	SLF CCR, Próstata e outros tumores	ILE157THR
Lee et al. (2001)	SLF	ARG145TRP
Bell et al. (1999) Walsh et al. (2006) Cybulski et al. (2006)	SLF CM, Próstata	1-BP DEL, 1422T 5.4-KB DEL
Cybulski et al. (2004, 2006) Shaag et al. (2005)	Próstata , outros tumores CM	IVS2DS, G-A, +1 SER428PHE

Diversos estudos mostram a importância do reconhecimento de pacientes com alto risco genético para síndromes hereditárias, que é fundamental para que

estratégias de rastreamento, diagnóstico precoce e prevenção possam ser desenvolvidas e oferecidas à estas famílias.

3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

3.1 Justificativa

O diagnóstico molecular está cada vez mais sendo utilizado como ferramenta no diagnóstico clínico e manejo no aconselhamento genético. O conhecimento da frequência de mutações nos genes envolvidos na predisposição hereditária ao câncer em nossa população bem como a padronização de métodos acurados de diagnóstico molecular é muito importante para que possamos estabelecer rotinas de rastreamento em programas de prevenção.

Considerando a alta incidência e prevalência do câncer de mama e de cólon no Brasil e a importância do diagnóstico precoce da predisposição hereditária ao câncer pelo grande potencial de prevenção nestes indivíduos e seus familiares, justifica-se verificar a frequência de alterações moleculares específicas para câncer hereditário em nosso meio.

3.2 Objetivos

3.2.1 Objetivo Principal

Determinar a frequência da mutação 1100delC no gene *CHEK2* em uma amostra de indivíduos brasileiros com diagnóstico clínico de síndrome de predisposição hereditária ao câncer de mama e cólon (do inglês: *Hereditary Breast and Colon Cancer*).

3.2.2 Objetivos Específicos

(1) Caracterizar as famílias quanto aos critérios clínicos para outras síndromes hereditárias de predisposição ao câncer de mama e cólon: HBOC (critérios NCCN e ASCO), SLF clássicos e SLF – Like (Birch, Eeles e Chompret) e Síndrome de Lynch (Amsterdã e Bethesda).

(2) Estimar a chance de o caso índice ser portador de uma mutação em *MLH1* e *MSH2* através de um modelo clínico de predição de risco, chamado PREMM I/II, *BRCA1/2*, utilizando as tabelas de prevalência de mutação do laboratório Myriad e o modelo PENN II.

4. REFERÊNCIAS

Abajo AS, Hoya M de la, Godino J, Furió V, Tosar A, Pérez-Segura P, et al. The *CHEK2* 1100delC allele is not relevant for risk assessment in HNPCC and HBCC Spanish families. *Familial Cancer*. 2005; 4: 183-186.

Abdel-Rahman WM, Peltomäki P. Lynch syndrome and related familial colorectal cancers. *Critical Reviews in Oncology*. 2008; 14:1-22.

Achatz MIW, Olivier M, Calvez FL, Planche-Martel G, Lopes A, Rossi BM, et al. The TP53 mutation, R337H, is associated with Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-like syndromes in Brazilian families. *Cancer Letters*. 2007; 245: 96-102.

Allain DC Genetic Counseling and Testing for Common Hereditary Breast Cancer Syndromes. *Journal of Molecular Diagnostics*. 2008; 10: 383-395.

Allinen M, Huusko P, Mantyniemi S, Launonem V, Winqvist R Mutation analysis of the *CHK2* gene in families with hereditary breast cancer. *British Journal of Cancer* 2001; 85:209-212.

ACS. American Cancer Society. Disponível em <http://www.cancer.org>. Acessado em Fevereiro de 2009.

Antoniou A, Pharoah PDP, Narod S, Risch HA, Eyfjord JE, Hopper JLet al. Average risks of breast and ovarian cancer associated with *BRCA1* or *BRCA2* detected in case series unselected for family history: a combined analysis of 222 studies. *American Journal of Human Genetics*. 2003;72:1117-1130.

Antoni L, Sodha N, Collins I, Garret MD. *CHK2* Kinase: cancer susceptibility and cancer therapy – two sides of the same coin? *Nature Reviews*. 2007;7:925-936.

Arnold CN, Goel A, Blum HE, Boland CR. Molecular pathogenesis of colorectal cancer: implications for molecular diagnosis. *Cancer*. 2005; 104:2035-47.

ASCO. American Society of Clinical Oncology. Disponível em <http://www.asco.org>. Acessado em janeiro de 2009.

Baudhuin LM, Mai M, French AJ, Kruckeberg KE, Swanson RL, Winters JL et al. Analysis of hMLH1 and hMSH2 gene dosage alterations in hereditary nonpolyposis colorectal cancer patients by novel methods. *Journal Molecular Diagnoses*. 2005; 7:226-35.

Balaguer F, Castells A. Identification of Lynch syndrome: are we close to the best strategy?. *Gastroenterology*. 2007; 133:353-5.

Bell DW, Varley JM, Szydlo TE, Kang DH, Wahrer DCR, Shannon KE et al. Heterozygous Germline hCHK2 Mutations in Li-Fraumeni Syndrome. *Science*. 1999; 286:2528-2531.

Boffetta P, Hashibe M Alcohol and cancer – Review. *Lancet Oncology*. 2006; 7: 149-56.

Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, et al. National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Research*. 1998; 58:5248-57.

Bougéard G, Limacher JM, Martin C, Charbonnier F, Killian A, Delattre O et al. Detection of 11 germline inactivating TP53 mutations and absence of TP63 and HCHK2 mutations in 17 French families with Li-Fraumeni or Li-Fraumeni-like syndrome. *Journal of Medical Genetics*. 2001; 38:253-257.

Cybulski C.; Gorski B.; Huzarski T.; Masojc B.; Mierzejewski M.; Debniak T et al. CHEK2 is a multiorgan cancer susceptibility gene. *American Journal Human Genetics* 2004. 75: 1131-1135.

Cybulski C.; Huzarski T.; Gorski B.; Masojc B.; Mierzejewski M.; Debniak T et al. A novel founder CHEK2 mutation is associated with increased prostate cancer risk. *Cancer Research*. 2004;64: 2677-2679.

Cybulski C, Huzarski T, Byrski T, Gronwald J, Debniaak T, Jakubowska A, et al. Estrogen receptor status in CHEK2-positive breast cancers: implications for chemoprevention. *Clinical Genetics*. 2009; 75: 72–78

Collaborative Group on Hormonal Factors Alcohol, tobacco and breast cancer—collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58,515 women with breast cancer and 95,067 women without the disease. *British Journal of Cancer*. 2002; 87:1234–1245.

de la Chapelle A. Genetic predisposition to colorectal cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2004; 4:769-80.

de Bock GH, Schutte M, Krol-Warmerdam EMM, Seynaeve C, Blom J, Brekelmans CTM et al. Tumour characteristics and prognosis of breast cancer patients carrying the germline CHEK2*1100delC variant. *Journal Medical Genetics*. 2004;41: 731-735.

Dong X, Wang L, Taniguchi K, Wang X, Cunningham JM, McDonnell SK et al. Mutations in CHEK2 associated with prostate cancer risk. *American Journal Human Genetics*. 2003; 72:270-280.

Egan KM, Newcomb PA, Longnecker MP, *et al.* Jewish religion and risk of breast cancer. *Lancet*. 1996; 347:1645-1646.

Fearon ER Human Cancer Syndromes: Clues to the Origin and Nature of Cancer. *Science*. 1997; 278:1043-1050.

Ferreira CG, Rocha JC. *Oncologia Molecular*. Capítulos 13, 17 e 29. 1º ed, São Paulo, Editora Atheneu 2004.

Firth FV, Hurst JA *Oxford Desk Reference – Clinical Genetics*. Capítulo 4. Nova York, Editora da Universidade de Oxford, 2005.

Frank TS, Deffenbaugh AM, Reid JE, Hulick M, Ward BE, Lingenfelter B, *et al.* Clinical characteristics of individuals with germline mutations in BRCA1 and BRCA2: analysis of 10.000 individuals. *Journal Clinical Oncology*. 2002;20:1480-1490.

Ghafoor A, Jemal A, Ward E, Cokkinides V, Smith R, Thun M *et al.* Trends in breast cancer by race and ethnicity. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2004; 54:181

Gonzalez KD, Noltner KA, Buzin CH, Gu D, Fong-Wen CY, Nguyen Vu Q *et al.* Beyond Li Fraumeni Syndrome: Clinical Characteristics of Families With p53 Germline Mutations. *Journal of Clinical Oncology*. 2009; 27: 1250-1256

Hadley DW, Jenkins JF, Steinberg SM, Liewehr D, Moller S, Martin JC *et al.* Perceptions of cancer risks and predictors of colon and endometrial cancer screening in women undergoing genetic testing for Lynch syndrome. *Journal Clinical Oncology*. 2008; 26:948-54.

Harris J, Lippman ME, Morrow M, et al. Diseases of the Breast. Lippincott-Raven. p. 162, 1996.

Hamilton SR, Aaltonen LA. World Health Organization Classification of Tumours of the Digestive System. IARC Press Lyon, 2000.

Henderson BE, Ross RK, Judd HL, Krailo MD, Pike MC. Do regular ovulatory cycles increase breast cancer risk? *Cancer*. 1985; 56:1206-1208.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. Disponível em <http://www.inca.gov.br>. Acessado em Fevereiro de 2009.

Isinger A, Bhat M, Borg A, Nibert M. *CHEK2* 1100delC in patients with metachronous cancer of the breast and colorectum. *BioMed Central Cancer*. 2006; 6:64.

Johnson N, Fletcher O, Naceur-Lombardelli C, dos Santos Silva I, Ashworth A, Peto J. Interaction between *CHEK2**1100delC and other low-penetrance breast-cancer susceptibility genes: a familial study. *Lancet* 2005; 366: 1554-1557.

Kilpivaara O, Vahteristo P, Falck J, Syrjakoski K, Eerola H, Easton D et al. *CHEK2* variant I157T may be associated with increased breast cancer risk. *International Journal of Cancer*. 2004; 111:543- 547.

Kilpivaara O, Alhopuro P, Vahteristo P, Aaltonen LA, Nevanlinna, H. *CHEK2* I157T associates with familial and sporadic colorectal cancer. *Journal Medical Genetics*. 2006; 43(7):e34 .

Lee SB, Kim SH, Bell DW, Wahrer DC, Schripo TA, Jorczak MM et al. Destabilization of *CHK2* by a missense mutation associated with Li-Fraumeni Syndrome. *Cancer Research*. 2001; 61:8062-7.

Lipton L, Thomas HJW, Eeles RA, Houlston RS, Longmuir M, Davison R et al. Apparent Mendelian inheritance of breast and colorectal cancer: chance, genetic heterogeneity or a new gene? *Familial Cancer*. 2002;1:189- 195

Lu HK, Broaddus RR. Gynecologic Cancers in Lynch Syndrome/HNPCC. *Familial Cancer*. 2005; 4:249-54,

Lu KH, Schorge JO, Rodabaugh KJ, Daniels MS, Sun CC, Soliman PT et al. Prospective determination of prevalence of lynch syndrome in young women with endometrial cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2007; 25:5158-64.

Margolin S, Eiberg H, Lindblom A, Bisgaard ML. CHEK2 1100delC is prevalent in Swedish early onset familial breast cancer. *BioMed Central Cancer*. 2007; 7:163.

Meijers-Heijboer H, van den Ouweland A, Klijn J, Wasielewski M, de Snoo A, Oldenburg R et al. Low-penetrance susceptibility to breast cancer due to CHEK2*1100delC in noncarriers of BRCA1 or BRCA2 mutations. *Nature Genetics*. 2002;31: 55-59.

Meijers-Heijboer H, Wijnen J, Vasen H, Wasielewski M, Wagner A, Hollestelle A et al. The *CHEK2* 1100delC mutation identifies families with a hereditary breast and colorectal cancer phenotype. *American Journal Human Genetics*. 2003; 72:1308-1314.

Mellemkjaer L, Dahl C, Olsen JH, Bertelsen L, Guldborg P, Christensen J, et al. The WECARE Study Collaborative Group. *British Journal of Cancer*. 2008;7:1-6

Miller CW, Ikezoe T, Krug U, Hofmann WK, Tavor S, Vegesna V et al. Mutations of the *CHK2* gene are found in some osteosarcomas, but are rare in breast, lung, and ovarian tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 2002;33: 17-21.

Myriad. Disponível em <http://www.myriad.com> . Acessado em dezembro de 2008.

NCCN. Disponível em: http://www.nccn.org/physian_gls/f_guideline.html (acessado em janeiro de 2009).

Nevanlinna H, Bartek J. The CHEK2 gene and inherited breast cancer susceptibility. *Nature*. 2006; 25:5912-5919.

Naseem H, Boylan J, Speake D, Least K, Shenton A, Lallo F et al. Inherited association of breast and colorectal cancer: limited role of *CHEK2* compared with high-penetrance genes. *Clinical Genetics*. 2006; 70: 388-395.

Narod AS, Lynch HT CHEK2 Mutation and Hereditary Breast Cancer. Editorial, *Journal of Clinical Oncology*. 2006; 25: 6-7

OMS. Organização Mundial da Saúde. <http://www.who.int/cancer/en/> Acessado em Fevereiro de 2009.

Offit K, Gilewski T, McGuire P, et al. Germline *BRCA1* 185delAG mutations in Jewish women with breast cancer. *Lancet*. 1996; 347:1643-1645.

Offit K. *Clinical Cancer Genetics – Risk Counseling & Management*. Printed in the United States of America, 1998.

Offit K, Garber JE. Time to CHEK2 in Families With Breast Cancer? Editorial, *Journal of Clinical Oncology*. 2008; 26:519-520.

Palmero EI, Faccini-Schüller L, Caleffi M, Achatz MIW, Olivier M, Martel-Planche G et al. Detection of R337H, a germline *TP53* mutation predisposing to multiple cancers, in asymptomatic women participating in a breast cancer screening program in Southern Brazil. *Cancer Letters*. 2008; 261:21-25

Pharoah PDP, Antoniou AC, Easton DF, Ponder BAJ. Polygenes, Risk Prediction, and Targeted Prevention of Breast Cancer. *The New England Journal of Medicine*. 2008; 358:2796-2803.

Penn II. Disponível em: <http://acgh.afcri.upenn.edu> (acessado em dezembro 2008).

PREMM 1,2 Disponível em: <http://www.dana-farber.org> (acessado em dezembro 2008)

Pike MC, Henderson BE, Casagrande JT, Rosario I, Gray GE. Oral contraceptive use and early abortion as risk factors for breast cancer in young women. *British Journal of Cancer*. 1981; 43 (1):72-6.

Robinson K L, Liu T, Vandrovcova J, Halvarsson B, Clendenning M, Frebourg T, et al. Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer) diagnostics. *Journal of the National Cancer Inst*. 2007; 99:291-9.

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

Ruijs MWG, Broeks A, Menko FH, Ausems MGEM, Wagner A, Oldenburg R, et al. The contribution of CHEK2 to the TP53-negative Li-Fraumeni phenotype. *Hereditary Cancer in Clinical Practice*. 2009; 7:4.

Schmidt MK, Tollenaar RAEM, de Kemp SR, Broeks A, Cornelisse CJ, Smit VTHBM et al. Breast Cancer Survival and tumor characteristics in premenopausal women carrying the *Chek2* 1100delC germline mutation. *Journal Clinical Oncology*. 2007; 25:64-69.

Schutte M, Seal S, Barfoot R, Meijers-Heijboer H, Wasielewski M, Evans DG et al. The Breast Cancer Linkage Consortium, Futreal PA, Nathanson KL, Weber BL, Easton DF, Stratton MR, Rahman N. Variants in *Chek2* other than 1100delc do not make a major contribution to breast cancer susceptibility. *American Journal of Human Genetics*. 2003; 72:1023-1028.

Shia J. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing for screening colorectal cancer patients at risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome. Part I. The utility of immunohistochemistry. *Journal Molecular Diagnoses*. 2008; 10(4):293-300.

Shaag A, Walsh T, Renbaum P, Kirchoff T, Nafa K, Shiovitz S et al. Functional and genomic approaches reveal an ancient CHEK2 allele associated with breast cancer in the Ashkenazi Jewish population. *Human Molecular Genetics*. 2005;14: 555-563.

Silveira GPG (Editor) *Ginecologia baseada em evidências*. 2008; Cap 41, 2° ed, São Paulo, Editora Atheneu.

Siddiqui R, Onel K, Facio F, Nafa K, Diaz LR, Kauff N et al. The TP53 mutational spectrum and frequency of CHEK2*1100delC in Li-Fraumeni-like Kindreds. *Familial Cancer* 2005; 4:177-181

Sodha N, Houlston RS, Bullock S, Yuille MA, Chu C, Turner G, Eeles RA. Increasing evidence that germline mutations in CHEK2 do not cause Li-Fraumeni syndrome. *Human Mutation* 2002; 20:460-462.

Sodha N, Houlston RS, Williams R, Yuille MA, Mangion J, Eeles RA. A robust method for detecting *Chk2/Rad53* mutations in genomic DNA. *Hum Mutation*. 2003;19:173-177.

Tavassoli FA, Devilee P. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs. IARC Press: Lyon, 2003.

The *CHEK2* – Breast Cancer Consortium Low – penetrance susceptibility to breast cancer due to *CHEK2**1100delC in noncarriers of BRCA1 ou BRCA2 mutations. Nature. 2002; 31:55-59.

The *CHEK2* – Breast Cancer Consortium *CHEK2**1100delC and Susceptibility to Breast Cancer: A Collaborative Analysis Involving 10,860 Breast Cancer Cases and 9,065 Controls from 10 Studies. American Journal of Human Genetics. 2004;74:1175-1182.

Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, Rüschoff J et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. Journal of the National Cancer Institute. 2004; 18;96:261-8.

Vahteristo P, Tamminen A, Karvinen P, Eerola H, Eklund C, Aaltonen LA et al. p53, CHK2, and CHK1 genes in families with Li-Fraumeni syndrome: further evidence of CHK2 in inherited cancer predisposition. Cancer Research. 2001; 61:5718-5722.

Vahteristo P, Bartkova J, Eerola H, Syrjakoski K, Ojala S, Kilpivaara O et al. *Chek2* genetic variant contributing to a substantial fraction of familial breast cancer. American Journal of Human Genetics. 2002; 71:432-438.

Vasen HFA. Clinical description of the Lynch syndrome [hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC)]. Familial Cancer. 2005; 4(3):219-25

Walsh T, Casadei S, Coats KH, Swisher E, Stray SM, Higgins J et al. Spectrum of mutations in BRCA1, BRCA2, CHEK2, and TP53 in families at high risk of breast cancer. *Journal of the American Medical Association*. 2006; 295:1379-1388.

Wasielewski M, Vasen H, Wijnen J, Hooning M, Dooijes D, Tops C, Klin JGM, Watson P, Riley B. The tumor spectrum in the Lynch syndrome. *Familial Cancer*. 2005; 4:245-8.

Wasielewski M, Bakker MA den, Ouweland A van den, Gelder ME Meijer-van, Portengen H, Klijn JGM et al. CHEK2 1100delC and male breast cancer in the Netherlands. *Breast Cancer Research Treatment*. 2008; DOI 10.1007/s 10549-008-0162-7

Wasielewski M, Vasen H, Wijnen J, Hooning M, Dooijes D, Tops C et al. CHEK2 1100delC Is a Susceptibility Allele for HNPCC-Related Colorectal Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2008; 14:4989-4994.

Ward LS. Entendendo o Processo Molecular da Tumorigênese. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2002; 46:4 .

Weischer M, Bojesen SE, Hansen AT, Axelsson CK, Nordestgaard BG. Increased risk of breast cancer associated with *Chek2* 1100delC. *Journal Clinical Oncology*. 2007; 25:57-63.

Weischer M, Bojesen SE, Ellervik C, Tybjaerg-Hansen, Nordestgaard BG. CHEK2 1100delC Genotyping for Clinical Assessment of Breast Cancer Risk: Meta-Analyses of 26,000 Patient Cases and 27,000 Controls. *Journal of Clinical Oncology*. 2008; 26:542-8.

5. PRODUÇÃO CIENTÍFICA

5.1 Capítulo de livro

MANUAL OPERACIONAL DA REDE NACIONAL DE CÂNCER FAMILIAL: PRINCIPAIS SÍNDROMES DE PREDISPOSIÇÃO HEREDITÁRIA AO CÂNCER, 2008

(13) Outras Síndromes de Predisposição Hereditária ao Câncer de Mama

Patricia Ashton-Prolla^{a,b}, Patricia Izetti Ribeiro^c, Jamile Abud^d

^a *Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul*

^b *Serviço de Genética Médica e Laboratório de Medicina Genômica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre*

^c *Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul*

^d *Programa de Pós-Graduação em Medicina: Gastroenterologia.*

5.2 Manuscrito

***CHEK2* 1100delC germline mutation: A frequency study in Hereditary Breast and Colon Cancer (HBC) Syndrome in Brazilian families.**

Jamile Abud^{a,b}; Silvia Liliana Cossio^{a,b,c}; Patrícia Izetti Ribeiro^{b,d}; Cristina Rossi^{b,d}; Fernando Regla Vargas^e; Miguel Ângelo Moreira^e; Maria Isabel Waddington Achatz^f; Patrícia Koehler Santos^{b,c}; Luciana Neves Nunes^g; Patricia Ashton-Prolla^{b,c,h,i}; João Carlos Prolla^{a,j}.

^a Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Gastroenterológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil.

^b Laboratório de Medicina Genômica, Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Brazil.

^c Instituto Nacional de Genética Médica Populacional (INAGEMP), Brazil.

^d Faculdade de Medicina, UFRGS, Porto Alegre, Brazil.

^e Instituto Nacional do Câncer, Rio de Janeiro, Brazil

^f Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, Brazil

^g Departamento de Estatística, UFRGS, Porto Alegre, Brazil.

^h Serviço de Genética Médica, HCPA, Porto Alegre, Brazil.

ⁱ Departamento de Genética, UFRGS, Porto Alegre, Brazil.

^j Unidade de Citopatologia, HCPA, Porto Alegre, Brazil.

Correspondence to:

Patricia Ashton-Prolla

Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos 2350, 90035-903 Porto Alegre RS, Brazil.

Tel.: + 55 51 2101 8011; fax: +55 51 3359 8010

E-mail address: pprolla@hcpa.ufrgs.br

Abstract

We have assessed the frequency of the *CHEK2* 1100delC germline mutation in 59 unrelated Brazilian individuals with clinical criteria for the Hereditary Breast and Colorectal Cancer syndrome (HBC) using a Long-range PCR strategy followed by sequencing. The 1100delC germline mutation was encountered in one (1,7%) individual. This indicates that the *CHEK2* 1100delC is not commonly encountered in Brazilian families with multiple diagnoses of breast and colorectal cancer. These results should be confirmed in a larger series of families and further testing should be undertaken to investigate.

Keywords: *CHEK2* 1100delC mutation; Hereditary Breast and Colon Cancer Syndrome, Hereditary Cancer Predisposition

Introduction

The *CHEK2* gene (OMIM#604373, also known as *CHK2*) is the mammalian homologue of the *Saccharomyces cerevisiae* RAD53 and *Schizosaccharomyces pombe* Cds1 genes. In humans, it is located in 22q12.1, and encodes a cell cycle checkpoint kinase that is implicated in DNA damage responses [1,2]. Following the occurrence of double-stranded DNA breaks, *CHEK2* is activated through phosphorylation by *ATM*. Activated *CHEK2* then phosphorylates critical cell-cycle proteins, including Cdc25A and Cdc25C phosphatases, P1K3 kinase and the E2F1 transcription factor, as well as proteins involved in DNA repair (such as *brca1*) and in regulation of cell death (such as *p53-mdm2* and *pml-1*). This reflects the wide mediator role of *CHEK2* in the signaling pathways in response to DNA damage, with direct impact on downstream effectors within the cell cycle checkpoints, DNA repair and apoptosis machineries. These findings has been well documented in cells that have a functional deficiency of *CHEK2* [3-5].

CHEK2 has been considered a candidate tumor suppressor gene, and germline mutations in this gene seem to predispose to familial Breast Cancer (BC) and other malignancies [6]. In 1999, germline mutations in *CHEK2* were associated with the Li-Fraumeni Syndrome (LFS) phenotype [7], however a strong association with the syndrome and this variants has never been confirmed [8]. In 1999, Bell *et al.* described for the first time the 1100delC mutation in exon 10 of *CHEK2* in families with breast and/or colorectal cancer. In 2003, Meijers-Heijboer *et al.* [9] investigated the frequency of *CHEK2* 1100delC in 55 families with multiple breast and colorectal cancer diagnoses and encountered the mutation in 18.2% of the analyzed families. Considering these results, the authors proposed a new phenotype associated to the *CHEK2* 1100delC mutation called Hereditary Breast and Colon Cancer Syndrome (HBCC, OMIM#604373). The majority of reports that associate germline *CHEK2* mutations with HBCC Syndrome, describe the 1100delC mutation. However, the association of *CHEK2* 1100delC with a high penetrance hereditary cancer syndrome is still controversial and the existence of

HBCC as a true syndromic entity has been questioned by some authors [10,11]. In fact, limited data is available in the literature on true associations of germline *CHEK2* mutations with the HBCC phenotype. Finally, in addition to the HBCC phenotype, germline *CHEK2* 1100delC mutation has also been associated with a high risk of occurrence of breast cancer and other tumors [12-15].

In this study, we describe the frequency of *CHEK2* 1100delC mutation in Brazilian families with multiple cases of breast and/or colorectal cancer.

Materials and Methods

Patient recruitment. A total of 112 families with multiple diagnoses of breast and/or colorectal cancer fulfilling HBCC criteria (described by Meijers-Heijboer *et al.* 2003, and Naseem *et al.* 2006) were recruited from cancer genetics clinics located in three Brazilian capitals: Rio de Janeiro (Instituto Nacional do Cancer, INCA), São Paulo (Hospital A. C. Camargo, HCACC) and Porto Alegre (Hospital de Clínicas de Porto Alegre, HCPA) between March 2007 and October 2008. In addition, families with multiple diagnoses of breast and colorectal cancer (at least one diagnosis and at least one patient under the age of 50 years), but not fulfilling the HBCC criteria described above, were also included (Table I). Of the 112 families interviewed, 59 unrelated index cases had their personal and family histories of cancer confirmed by medical records, pathology reports and/or death certificates, and agreed to participate in the study, providing clinical data and biological samples after informed consent. Clinical data were obtained from review of medical records and from patient interviews by a clinical geneticist. Medical and family histories (FH) were recorded in detailed pedigrees with information traced as far backwards and laterally as possible, extending to paternal lines and including a minimum of three generations. Confirmation of cancer in the FH was attempted in all cases and pathology reports, medical records and/or death certificates were obtained whenever possible for relatives. Detailed information on tumor type, diagnosis and treatment were obtained for all index cases. All pedigrees were classified according to the clinical phenotypes that were observed. In addition to

previously described criteria for the diagnosis of HBCC [9,11], families were also reviewed for the presence of criteria for other cancer predisposition syndromes: HBOC [16,17], LFS/LFL (Classic, Birch, Eeles and Chompret) [18-22] and Lynch syndrome (Amsterdam, Bethesda) [23,24]. All pedigrees and phenotypic criteria attributions were reviewed independently by two clinical geneticists. The study was approved by the local ethics committees in all three participating institutions.

Genotyping. DNA was extracted from peripheral blood using the *Illustra blood genomicPrep Mini Spin* kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Samples were submitted to PCR amplification using a long-range PCR methodology as described by Sodha N *et al.* (2002) [25]. Amplified products were submitted to sequencing in an ABI 3730 automated sequencer using the Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA) as described by the manufacturer. All analysis were performed in duplicates.

Statistical Analysis. SPSS version 15.0 was used for data handling and statistical analyses. For descriptive analysis, categorical variables were described by their absolute and/or relative frequencies and quantitative variables were expressed as mean and standard deviation (SD).

RESULTS

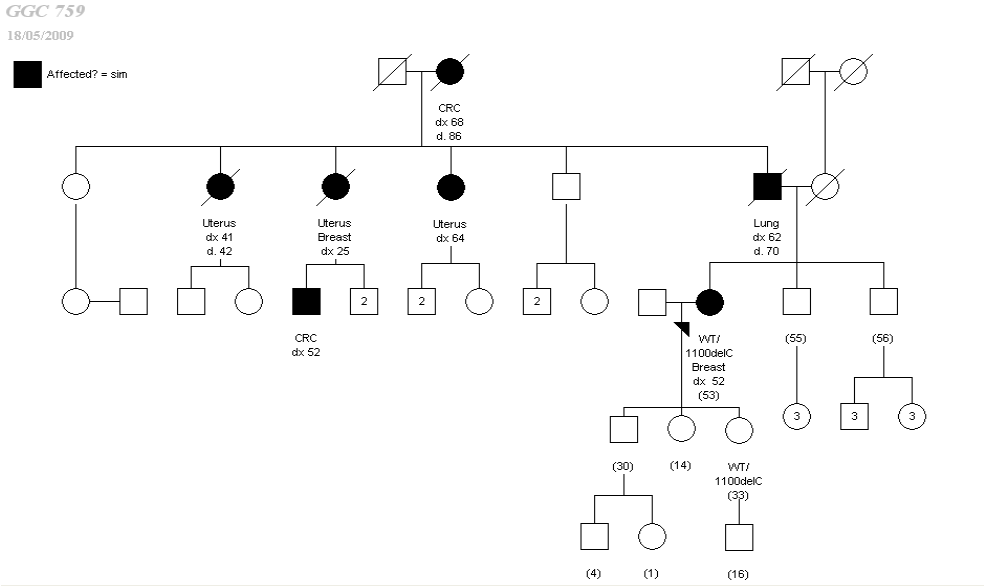
Clinical data of the 59 patients included are summarized in Table II. The mean age at recruitment was 48.5 years and the majority of probands were affected with breast cancer (69.6%). The average prior probability of being a carrier of a *BRCA* mutation in the overall sample was 16,0% and 16,4% using the mutation prevalence tables [26] and the Penn II model [27] respectively. Among breast cancer-affected probands (n=41) the overall probability of carrying a *BRCA* mutation was 20% and 18.2% using these two models, respectively. The prior probability of being a germline MMR mutation carrier (*MLH1* and *MSH2* genes)

using the Premm 1,2 Model [28] was 7.3% in the overall sample and 13.8% among CRC affected probands.

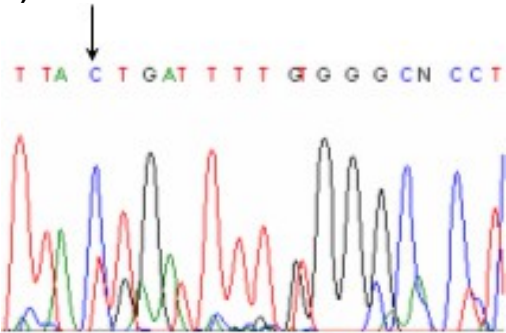
CHEK2 1100delC mutation was identified in one of the 59 (1,7%) individuals included. The *CHEK2* 1100delC germline mutation carrier is a 61 year-old woman diagnosed with breast cancer at the age of 52 years, her family matched clinical criteria for HBCC according to Meijers-Heijboer *et al.* and Naseem *et al.* and none of the other criteria for hereditary breast and colorectal cancer syndromes that were considered in this study (Fig 1). Proband tumor's characteristics included an invasive ductal carcinoma histology, HER-2/neu oncoprotein overexpression, positive staining for progesterone receptor and negative for estrogen receptor.

Fig 1: a) Pedigree of the patient identified as *CHEK2* 1100delC mutation carrier. Cancer-affected individuals are shown in blackened symbols. Arrowhead indicates proband; current age is indicated in parenthesis. Dx: age at diagnosis; d: age at death; wt: wild-type. **b)** Proband's electropherogram: direct sequencing of *CHEK2* exon 10 indicating frameshift after the 1100C position.

a)



b)



Discussion

A recurrent mutation in the *CHEK2* gene (1100delC) was first reported to be an important cause of breast cancer by Meijers-Heijboer *et al.* in 2002 [9]. Since then, numerous studies have documented the prevalence of this single mutation in breast cancer-affected women from different countries. In a recent meta-analysis study, Weischer *et al.* [15] conclude that *CHEK2* 1100delC is an important breast cancer-predisposing mutation, which increases the risk of developing breast cancer by three-to five-fold in its carriers. In 2008, Wasielewski *et al.* [29], found a frequency of 4.2% of *CHEK2* 1100delC mutation in 237 patients diagnosed with Lynch Syndrome, compared with a frequency of 1.0% in population controls, suggesting a strong association of this specific mutation with familial colorectal cancer (P=0.002).

In our study, we assessed the *CHEK2* 1100delC mutation among families with multiple breast and colorectal cancer diagnoses, and we encountered a frequency of 1.7% (1/59 individuals), which is significantly lower than reported originally by Meijers-Heijboer *et al.* [9] in families with similar cancer histories. Several mutation prevalence studies among HBCC families in different countries point to a frequency of *CHEK2* 1100delC below 5% among HBCC families, including studies in Sweden, Spain and the United Kingdom [30,31,11]. However, in the Netherlands, the *CHEK2* 1100delC mutation appears to be unusually frequent, this is reflected in the finding that 4% of women with early onset breast cancer (irrespective of CRC history in the family) carry *CHEK2* 1100delC. In other northern European countries, the frequency of the mutation among early-onset BC patients varies from 2.3% (Germany) and 2.5% (Finland). Finally, in certain countries (Spain, Australia) its frequency seems to be very low [32]. Based on these data, the worldwide distribution of the *CHEK2* 1100delC mutation is clearly heterogeneous and the definition of its relevance in different countries should be known before mutation screening initiatives are considered.

An important finding of our study is that the majority of families with the HBCC phenotype also fulfilled criteria for other cancer predisposition syndromes, like

SLF/LFL, Lynch. Considering this fact, we conclude that in our sample of Brazilian families, recruited from the Southern and Southeastern regions of the country and with a strong family history of breast and colorectal cancer, *CHEK2* 1100delC is not frequent. Further investigations of other *CHEK2* mutations and/or mutations in other cancer predisposition genes are being undertaken in these families.

ACKNOWLEDGMENTS

We are indebted to the patients and their family members who agreed to participate in this study and to Fundação de Incentivo à Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA) and Programa de Pós-Graduação em Ciências Gastroenterológicas (UFRGS) who provided funding for this study. We thank Amanda de Nobrega, RN for help with patient recruitment and Edenir Inez Palmero, PhD, for help with molecular methods.

References

- [1] C. Cybulski, B. Górski, T. Huzarski, B. Masojć, M. Mierzejewski, T. Debniak, U. Teodorczyk, T. Byrski, J. Gronwald, J. Matyjasik, E. Zlowocka, M. Lenner, E. Grabowska, K. Nej, J. Castaneda, K. Medrek, A. Szymańska, J. Szymańska, G. Kurzawski, J. Suchy, O. Oszurek, A. Witek, S. Narod, J. Lubiński, CHEK2 is a multiorgan cancer susceptibility gene. *Am J Hum Genet* 75 (2004) 1131-1135.
- [2] L. Koppert, M. Schutte, M. Abbou, H. Tilanus, W. Dinjens, The CHEK2(*)1100delC mutation has no major contribution in oesophageal carcinogenesis. *Br J Cancer* 90 (2004) 888-891.
- [3] H. Nevanlinna, J. Bartek, The CHEK2 gene and inherited breast cancer susceptibility. *Oncogene* 25 (2006) 5912-5919.
- [4] The CHEK2 - Breast Cancer Consortium CHEK2*1100delC and Susceptibility to Breast Cancer: A Collaborative Analysis Involving 10,860 Breast Cases and 9,065 Controls from 10 Studies, *AM. J. Hum. Genet.* 74 (2004) 1175-1182.
- [5] M. Schutte, S. Seal, R. Barfoot, H. Meijers-Heijboer, M. Wasielewski, D. Evans, D. Eccles, C. Meijers, F. Lohman, J. Klijn, A. van den Ouweland, P. Futreal, K. Nathanson, B. Weber, D. Easton, M. Stratton, N. Rahman, Variants in CHEK2 other than 1100delC do not make a major contribution to breast cancer susceptibility. *Am J Hum Genet* 72 (2003) 1023-1028.
- [6] L. Antoni, N. Sodha, I. Collins, M. Garrett, CHK2 kinase: cancer susceptibility and cancer therapy - two sides of the same coin? *Nat Rev Cancer* 7 (2007) 925-936.

- [7] D. Bell, J. Varley, T. Szydlo, D. Kang, D. Wahrer, K. Shannon, M. Lubratovich, S. Verselis, K. Isselbacher, J. Fraumeni, J. Birch, F. Li, J. Garber, D. Haber, Heterozygous germ line hCHK2 mutations in Li-Fraumeni syndrome. *Science* 286 (1999) 2528-2531.
- [8] M. Ruijs, A. Broeks, F. Menko, M. Ausems, A. Wagner, R. Oldenburg, H. Meijers-Heijboer, L. Van't Veer, S. Verhoef, The contribution of CHEK2 to the TP53-negative Li-Fraumeni phenotype. *Hered Cancer Clin Pract* 7 (2009) 4.
- [9] H. Meijers-Heijboer, J. Wijnen, H. Vasen, M. Wasielewski, A. Wagner, A. Hollestelle, F. Elstrodt, R. van den Bos, A. de Snoo, G. Fat, C. Brekelmans, S. Jagmohan, P. Franken, P. Verkuijlen, A. van den Ouweland, P. Chapman, C. Tops, G. Möslein, J. Burn, H. Lynch, J. Klijn, R. Fodde, M. Schutte, The CHEK2 1100delC mutation identifies families with a hereditary breast and colorectal cancer phenotype. *Am J Hum Genet* 72 (2003) 1308-1314.
- [10] L. Lipton, H. Thomas, R. Eeles, R. Houlston, M. Longmuir, R. Davison, S. Hodgson, V. Murday, C. Norbury, C. Taylor, I. Tomlinson, Apparent Mendelian inheritance of breast and colorectal cancer: chance, genetic heterogeneity or a new gene? *Fam Cancer* 1 (2001) 189-195.
- [11] H. Naseem, J. Boylan, D. Speake, K. Leask, A. Shenton, F. Laloo, J. Hill, D. Trump, D. Evans, Inherited association of breast and colorectal cancer: limited role of CHEK2 compared with high-penetrance genes. *Clin Genet* 70 (2006) 388-395.
- [12] D. Allain, Genetic counseling and testing for common hereditary breast cancer syndromes: a paper from the 2007 William Beaumont hospital symposium on molecular pathology. *J Mol Diagn* 10 (2008) 383-395.

- [13] P. Vahteristo, J. Bartkova, H. Eerola, K. Syrjäkoski, S. Ojala, O. Kilpivaara, A. Tamminen, J. Kononen, K. Aittomäki, P. Heikkilä, K. Holli, C. Blomqvist, J. Bartek, O. Kallioniemi, H. Nevanlinna, A CHEK2 genetic variant contributing to a substantial fraction of familial breast cancer. *Am J Hum Genet* 71 (2002) 432-438.
- [14] M. Weischer, S. Bojesen, A. Tybjaerg-Hansen, C. Axelsson, B. Nordestgaard, Increased risk of breast cancer associated with CHEK2*1100delC. *J Clin Oncol* 25 (2007) 57-63.
- [15] M. Weischer, S. Bojesen, C. Ellervik, A. Tybjaerg-Hansen, B. Nordestgaard, CHEK2*1100delC genotyping for clinical assessment of breast cancer risk: meta-analyses of 26,000 patient cases and 27,000 controls. *J Clin Oncol* 26 (2008) 542-548.
- [16] ASCO. American Society of Oncology. <http://www.asco.org>.
- [17] NCCN. National Comprehensive Cancer Network. <http://www.nccn.org>.
- [18] F.P. Li, J.F. Fraumeni Jr, J.J. Mulvihill, W.A. Blattner, M.G. Dreyfus, M.A. Tucker, E.W. Miller, A cancer family syndrome in twenty-four kindreds. *Cancer Res.* 48 (1988) 5358-5362.
- [19] J. Birch, A. Hartley, K. Tricker, J. Prosser, A. Condie, A. Kelsey, M. Harris, P. Jones, A. Binchy, D. Crowther, Prevalence and diversity of constitutional mutations in the p53 gene among 21 Li-Fraumeni families. *Cancer Res* 54 (1994) 1298-1304.
- [20] M. Olivier, D. Goldgar, N. Sodha, H. Ohgaki, P. Kleihues, P. Hainaut, R. Eeles, Li-Fraumeni and related syndromes: correlation between tumor type, family structure, and TP53 genotype. *Cancer Res* 63 (2003) 6643-6650.

- [21] A. Chompret, A. Abel, D. Stoppa-Lyonnet, L. Brugières, S. Pagés, J. Feunteun, C. Bonaïti-Pellié, Sensitivity and predictive value of criteria for p53 germline mutation screening. *J Med Genet* 38 (2001) 43-47.
- [22] A. Chompret, L. Brugières, M. Ronsin, M. Gardes, F. Dessarps-Freichay, A. Abel, D. Hua, L. Ligoit, M. Dondon, B. Bressac-de Paillerets, T. Frébourg, J. Lemerle, C. Bonaïti-Pellié, J. Feunteun, P53 germline mutations in childhood cancers and cancer risk for carrier individuals. *Br J Cancer* 82 (2000) 1932-1937.
- [23] H. Vasen, Clinical description of the Lynch syndrome [hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC)]. *Fam Cancer* 4 (2005) 219-225.
- [24] C. Boland, S. Thibodeau, S. Hamilton, D. Sidransky, J. Eshleman, R. Burt, S. Meltzer, M. Rodriguez-Bigas, R. Fodde, G. Ranzani, S. Srivastava, A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 58 (1998) 5248-5257.
- [25] N. Sodha, R.S. Houlston, R. Williams, M.A. Yuille, J. Mangion, R.A. Eeles, A Robust Method for Detecting CHK2/RAD53 Mutation in Genomic DNA, *Human Mutation*. 19 (2002) 173-177.
- [26] Penn II. <http://acgh.afcri.upenn.edu>
- [27] Myriad. <http://www.myriad.com>
- [28] PREMM 1,2. <http://www.dana-farber.org>

- [29] M. Wasielewski, H. Vasen, J. Wijnen, M. Hooning, D. Dooijes, C. Tops, J.G.M. Klin, H. Meijers-Heijboer, M. Schutte, CHEK2 1100delC is a Susceptibility Allele for HNPCC-Related Colorectal Cancer, *Clinical Cancer Research*. 14 (2008) 4989-4994.
- [30] A. Isinger, M. Bhat, A. Borg, M. Nilbert, CHEK2 1100delC in patients with metachronous cancers of the breast and the colorectum. *BMC Cancer* 6 (2006) 64.
- [31] A. Sánchez de Abajo, M. de la Hoya, J. Godino, V. Furió, A. Tosar, P. Pérez-Segura, E. Díaz-Rubio, T. Caldés, The CHEK2 1100delC allele is not relevant for risk assessment in HNPCC and HBCC Spanish families. *Fam Cancer* 4 (2005) 183-186.
- [32] S. Narod, H. Lynch, CHEK2 mutation and hereditary breast cancer. *J Clin Oncol* 25 (2007) 6-7.

Tables

Table I. Clinical Criteria HBCC Syndrome

Meijers-Heijboer (7)

At least two patients with breast cancer who were first- or second-degree relatives and of whom at least one is diagnosed before age 60 years and

1. At least one patient with breast cancer and colorectal cancer diagnosed at any age; or
2. At least one individual with colorectal cancer diagnosed before age 50 years who was a first- or second-degree relative of a patient with breast cancer; or
3. At least two patients with colorectal cancer diagnosed at any age of whom at least one was a first or second-degree relative of a patient with breast cancer.

Naseem (11)

1. At least one patient with breast cancer and colorectal cancer diagnosed at any age, and an additional case of BC or CRC in a first- or a second-degree relative,
2. At least one individual with CRC diagnosed before the age of 50 years who was a first- or second-degree relative of a patient with BC, and the BC was ,50 or there were at least two BCs in first- or second-degree relatives or
3. At least two patients with CRC diagnosed at any age, of whom at least one was a first- or second-degree relative of a patient with BC and the BC was ,50 or there were at least two BCs in first- or second-degree relatives

Suggestive HBCC (in the present study)

1. At least one patient with breast cancer and an additional two cases of colorectal cancer at any age; or
2. At least one patient with colorectal cancer and an additional two cases of breast cancer at any age.

Table II. Demographic and Clinical Features of the sample studied, n=59

Features	N	%	Mean (Range)	SD
Proband				
Sex				
Female	53	89.8	-	-
Origin				
RS	28	47.5	-	-
SP	14	23.7	-	-
RJ	17	28.8	-	-
Cancer Type				
BC	29	49.2	-	-
CRC	12	20.3	-	-
Multiple*	15	25.5	-	-
Other**	3	5.1	-	-
Age of cancer onset	-	-	48.5 (29-75)	10.90
Family				
Cancer diagnoses				
Number of cancer-affected generations	-	-	2.8	-
Number of CRC cancers	-	-	1.8	-
Number of Breast cancers	-	-	3.1	-
Total CRC + BC per family	-	-	4.8	-
Criteria				
Meijer-Heijboer et al.[7]	16	27.1	-	-
Naseem et al.[11]	28	47.5	-	-
Suggestive	29	49.2	-	-
Criteria for other cancer	53	88.3	-	-
predisposition syndromes				
Lynch				
Amsterdam	7	11.9	-	-
Bethesda	23	39.0	-	-
HBOC				
ASCO	22	37.3	-	-
NCCN	25	42.4	-	-
LFS/LFL				
Classic	0	-	-	-
Chompret	4	6.8	-	-
LFL	29	49.2	-	-

*BC (n=5), CRC + BC (n=5), CRC + other (n=3), BC + other (n=2).

**Other cancer: one thyroid, one ovary and one endometrium.

LFL included Birch (n=3, 5.1%) and Eeles (n=26, 44.1%) criteria.

Abbreviations: RS, Rio Grande do Sul – Brazil; SP, São Paulo – Brazil; RJ, Rio de Janeiro – Brazil; HBOC, Hereditary Breast and Colon Cancer; LFS, Li Fraumeni syndrome; LFL, Li Fraumeni Like.

Supplementary data

ID	HBCC Criteria	Others Syndromes Criteria	Proband cancer site	Other cancer diagnoses relatives (by site)
1	M - H + Naseem	-	Breast (F-47)	Breast (F-51, F-80, F-70, F-50); CRC (M-ND, F-69); Lung and Breast (F-72); Gastric (M-ND, M-ND); Bladder(M-ND); Unknown (F-ND)
2	M - H + Naseem	-	Breast (F-42)	BBC (F-45, F-65); CRC (M-50, M-70); Uterine and Ovarian (F-40); Esophageal and Gastric (M- ND); Carcinoma Basocel (F-ND)
3	Naseem	HNPCC (Bethesda) + LFL (Eeles1)	Breast (F-43), CRC (F-48)	Melanom (F-47); Leukemia (M-6); CRC (F-73); Bladder (F-65)
4	M - H + Naseem	Lynch (Bethesda) + LFL (Eeles1, Eeles2, Birch)	CRC (F-42)	Skin and Breast (F-43); Carcinoma Basocel (M-60); Lung(M-62, M-78, M-73, M-ND, M-ND); Skin (F-38, F- ND); Breast (F-<50, F-62); Prostate (69); Stomach (M-70, ND- ND); Liver (F-38); Throat (M-46); Sarcoma (F-19); Eye (F-ND)
5	Suggestive	HBOC(NCCN), Lynch (Amsterdam and Bethesda)	BBC (F-39,F-48)	Liver (M-ND); Uterus (F-32); CRC (F-60, F-57); Stomach (F-ND)
6	Suggestive	HBOC (NCCN)	Breast (F-38)	Breast (F-37); CRC (M-ND); Ovary (F-38)
7	Naseem	-	Breast (F-61) and CRC (F-68)	Breast (F-30, F-42, F-90, F-ND, F-ND); Gastric (M-68); Throat (M-60); Uterus (F-ND)
8	Naseem	Lynch (Bethesda) HBOC (NCCN, ASCO)	BC (F-45) CRC (F-49)	CRC (F-48); BC (F-40); Lung (M->60); Liver (M->70)
9	M - H + Naseem	Lynch (Bethesda)	CRC (F-38)	CRC (M-52); BC (F-52, F-40); Gastric (F-ND); Head/Neck (M-ND)
10	Suggestive	LFS (Eeles1)	BBC (F-47, F-49)	BC (F-<50, F-51, F-47, F-45); Leukemia (M-23); Stomach (M-ND); CRC (F-ND)
11	Suggestive	Lynch (Amsterdam, Bethesda); HBOC (ASCO); LFS (Eeles1)	CRC (M-62) Prostate (58)	Stomach (M-70, F-50); BC (F-50, F-80, F-58); Uterus (70, <50, ND); Lung (M-ND); Throat (M-ND)
12	Suggestive	HBOC (NCCN)	Bil BC (F-34, F-44)	BC (F-ND); CRC (F-75); Stomach (M-45)
13	Suggestive	HBOC (ASCO)	BC (F-75)	CRC (M-64); BC (F-60, F-60, F-63, F-68); Endometrium (70); Uterus (84); Ovary (>70)

14	Suggestive	HBOC (ASCO, NCCN) LFS (Eeles1)	BC (F-37)	Ovary (61); BC (F-40, F-39); Leukemia (F-53, M-19); CRC (M-72)
15	Naseem	HBOC (ASCO, NCCN)	BC (F-44)	CRC (M-28); BC (F-38); Liver (F-46, F-60)
16	Suggestive	Lynch (Bethesda) LFS (Eeles1)	CRC (F-72)	Uterus (50); CRC (F-35, M-13, F-60); BC (F-60); Prostate (-ND, -ND); Pancreas (F-ND); Liver (F-ND, F-40); Ovary (68); Esophagus (M->70)
17	Suggestive	HBOC (ASCO, NCCN) LFS (Eeles1)	BC (F-44)	BC (F-32, F-49); BBC (F-40, 55); Gastric (M-ND, M-ND, M-ND); CRC (M-ND); Esophagus (M-12)
18	M – H + Naseem	-	BC (F-52)	Lung (M-62), Uterus (64, 25, 41); BC (F-25); CRC (F-68)
19	Suggestive	LFS (Eeles1)	Bil BC (F-65)	BC (F-ND, F-36, F-82); Lung (F-ND); CRC (M-ND), Leukemia (M-ND)
20	Naseem	LFS (Eeles1)	BC (F-55)	BC (F-50, F-40); CRC (F-79, F-37); Prostate (ND); Uterus (84)
21	Suggestive	-	CRC (F-70)	BBC (F-70); BC (F-45); Abdominal (M-ND, M-ND, F-ND, F-ND)
22	Naseem	-	BC (F-50)	CRC (M-65, F-48, F-64)
23	Naseem	Lynch (Bethesda) LFS (Birch, Eeles1 e 2, Chompret)	Prostate (63) Sarcoma (36) CRC (55)	BC (F-29); CRC (M-38)
24	Suggestive	-	BC (70)	BBC (F-36); BC (F-70); CRC (F-52)
25	M – H + Naseem	Lynch (Bethesda) HBOC (ASCO, NCCN) LFS (Eeles1)	BC (F-49)	CRC (F-30, M-ND); Ovary (40); BC (F-<50) Esophagus (F-79); Lung (M-ND, M-ND, M-ND) Liver (M-60), Leukemia (M-19)
26	Naseem	Lynch (Bethesda) LFS (Eeles1)	BC (F-56) CRC (F-60)	Lymphoma Hodgkin (F-19); CRC (M->50, F-33); Gastric (M-38, F->50); BC (F-48); SNC (M-53); Liver (M-74); Pituitary Gland (M-78); Melanom (F-65)
27	M _ H + Naseem	Lynch (Bethesda) HBOC (ASCO, NCCN)	BC (F-31)	BC (F-37, F-31, F-39, F-36, F-ND, M->50, F->50); CRC (F->50); Stomach (M->50)
28	Suggestive	LFS (Eeles1)	BC (F-44)	BC (F-46, F-43, F-73); Melanom (F-36); Ovary (17); CRC (F-60); Lip (M-ND); Skin (M-70); Face (M-ND, M-ND), Uterus(60), Prostate (80); Esophagus (M-50)
29	Suggestive	Lynch (Amsterdam) LFS (Birch, Eeles1)	CRC (M-53)	BC (F-80, F-49); Stomach (M-50, M-70); Leukemia (ND-4); Skin (M-85);Kidney (M-60)
30	Suggestive	Lynch (Bethesda) LFS (Eeles1)	CRC (M-63)	BC (F-70); CRC (F-30); Leukemia (M-52); Stomach (-70); Eye (M-ND); Throat (M-ND)

31	M – H + Naseem	HBOC (ASCO, NCCN)	BC (F-41)	BC (F-32, F-35, F-28, F-<50); CRC (M-50); Kidney (M-ND); Lung (M-ND, M-ND); Spinal Cord (M-ND)
32	Suggestive	Lynch (Amsterdam, Bethesda)	CRC (F-40)	CRC (M-58); Gastric (M-45, M-49); Esophagus (M-47); BC (F-52)
33	M – H + Naseem	HBOC (ASCO, NCCN)	BC (F-38)	BC (F-36, F-62, F-25, F-ND); Uterus (M-ND); CRC (M-48, M-ND, M->50); Ovary (ND); Prostate (ND); Head (M-ND)
34	Suggestive	HBOC (ASCO, NCCN)	BC (F-47), Endometrium (53)	BC (F-41); CRC (F-ND, M-ND)
35	Naseem	Lynch (Amsterdam) LFS (Eeles1)	CRC/Hybrid (M-45)	BC (F-40, F-<50); CRC (F-60, F-63, F->70, F->70); Gynecologic (F-60, F-37); Stomach (M-42); Prostate (71)
36	Naseem	Lynch (Bethesda) HBOC (ASCO)	CRC (F-45)	BC (F-46, F-84); BBC (F-41); CRC (M-97, M-ND); Gastric (F-89); Lung (M-ND); Larynx (M-ND); Vocal Folds (M-ND); Endometrium (ND)
37	Suggestive	Lynch (Bethesda) HBOC (NCCN)	BC (F-45)	BC (M-76); Uterus (50, 65); CRC (F-35); Sarcoma (F-50); Lung (M-60); Ovary (65)
38	Suggestive	Lynch (Bethesda) HBOC (NCCN)	CRC (F-39) Ovary (43)	CRC (F-50); BC (F->50)
39	Suggestive	HBOC (ASCO, NCCN) LFS (Eeles1)	BC (F-40)	BC (F-39, F-40); CRC (F-67); Lymphoma Hodgkin (M-60)
40	Suggestive	HBOC (ASCO, NCCN) LFS (Chompret)	BC (F-47)	Ovary (46, 30), BC (F-40); CRC (F-60)
41	Suggestive	HBOC (ASCO, NCCN) LFS (Chompret)	BC (F-44)	BC (F-28, F-47); Lung (M->70); CRC (M-ND)
42	Suggestive	HBOC (ASCO, NCCN)	BBC (F-39, F-50)	BC (F-<50, F-70); Uterus (>30); CRC (M-60)
43	Naseem	Lynch Bethesda	CRC (F-44)	Uterus (40, 53); BC (F-50); CRC (F-ND); Esophagus (M-60); Spinal Cord (M-60); Leukemia (F-52)
44	M - H	LFS (Eeles1)	BC (F-46)	Skin (M-59); CRC (F-50); Prostate (>70); BC (F-63, F->60)
45	Naseem	LFS (Eeles1)	Thyroid (F-ND)	Central nervous system (M-ND); Skin (M-ND, F-ND); Prostate (>50); CRC (M-ND, M -59); BC (F-46)
46	M - H	HBOC (ASCO, NCCN)	BC (F-48)	BC (F-70, F-55, F-50, F-65); BBC (F-ND); CRC (F-ND, M-60)
47	Naseem	Lynch (Amsterdam,	CRC (F-50)	BC (F-55, F-ND); CRC (F-30,

		Bethesda)		F-42); Stomach (M-83); Glioblastoma (F-20)
48	Suggestive	HBOC (NCCN)	BC (F-43)	Skin (M-ND, M-ND, M-ND, M-17); BC (F-<50, F-68, F-53); CRC (M-57), Stomach (M-78)
49	M – H + Naseem	HBOC (ASCO, NCCN)	BC (F-49) CRC (56)	CRC (F-75, M-50); BC (F-53, F-43, F-67); Gastric (M-56)
50	M – H + Naseem	Lynch (Bethesda)	BBC (F-43)	BC (F-54, F-43, F-ND, F-ND, F->44); Uterus (65); CRC (M->60, F-56, M-ND, M-ND, M-ND, F->80); Pituitary Gland (M-42); Esophagus (->50)
51	M – H + Naseem	LFS (Eeles1)	BC (F-55) Hybrid (F-61)	BC (F-43, F-64); CRC (F-50); Hybrid (F-44); Esophagus (M-ND, M-ND, F-64, M-ND); Throat(M-ND); Pancreas (M-32)
52	Suggestive	LFS (Eeles1)	BC (F-61)	BC (F-41); CRC (M-52)
53	Suggestive	HBOC (ASCO, NCCN) LFS (Eeles1)	BC (M-73)	BC (F-63, F-52, F-49, F-<50); CRC (M-72); Lung (F-45); Prostate (66, ND); Liver (F-72); Spine Cord (M-56); Testicle (ND)
54	Naseem	Lynch (Amsterdam, Bethesda) LFS (Eeles1, Chompret)	CRC (F-71)	BC (F-<50); Skin (M-ND, F-ND); CRC (F-60); Stomach(M- 41, F-60); Lymphoma (F-ND, M-ND); Leukemia (F-ND); SNC (M-33, M-ND)
55	Suggestive	LFS (Eeles1)	BC (F-36)	BC (F-61, F-48, F-45); CRC (M-65); Prostate(60) Gastric (F-57); Hybrid (F-ND)
56	M – H + Naseem	Lynch (Bethesda) HBOC (ASCO, NCCN)	BC (F-48)	CRC (F-36); BC (F-36)
57	M – H + Naseem	Lynch (Bethesda) HBOC (ASCO, NCCN)	Ovary (52)	BC (F-36, F-44, F-45, F-44, F-62); CRC (M-ND, F-45, F- 69); Stomach (M-ND, M-68); Lung (M-ND), Uterus (62, ND, 78) Ovary (66, 76); Throat (M-ND)
58	Suggestive	Bethesda	Endometrium (45)	Skin (F-ND), CRC (F-ND, M-ND, M-69); BC (F-38, F-ND); Testicle (ND)
59	Suggestive	HBOC (ASCO, NCCN)	BC (F-29)	BC (F-26, F-50, F-47, F-43); Bone (M-53, M-77); Liver (M-57, M-59); CRC (M-66)

Abbreviations: BBC, Bilateral Breast Cancer; BC, Breast Cancer; CRC, Colorectal Cancer; F, Female; M, Male; ND: Non Determined.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As considerações finais desta dissertação serão descritas de acordo com os objetivos propostos.

O objetivo principal deste estudo foi estimar a frequência da mutação 1100delC no gene *CHEK2* em uma amostra composta por indivíduos brasileiros em risco para câncer de mama e cólon hereditários. Encontramos uma frequência da mutação 1100delC no gene *CHEK2* de 1,7%. Esta frequência é significativamente menor do que a observada nos estudos originais que relacionam a mutação ao fenótipo de síndrome HBCC na Holanda. No entanto, em outros estudos de frequência da mutação entre famílias HBCC, como a de Nasseem e cols. (2006) com famílias inglesas e Isinger e cols. (2006) com famílias suecas, as frequências de mutação *CHEK2* 1100delC foram similares àquela encontrada aqui, com valores de 1% e 2,5%, respectivamente.

Apesar de apenas um indivíduo apresentar a mutação 1100delC no gene *CHEK2* na amostra total de 59 pacientes estudados, identificamos uma outra alteração no sequenciamento do exon 10 em 23,7% dos pacientes (14/59) não descrita anteriormente. Observamos esta variante de seqüência em uma região localizada aproximadamente 100 pares de bases após a região de interesse, e ocorre uma alteração no padrão do eletroferograma com alteração de fase, o que reflete provavelmente uma deleção ou inserção de um pequeno número de bases. Continuaremos a investigação para elucidar as características dessa variante de seqüência por sequenciamento individualizado de cada um dos alelos do gene em cada um dos 14 pacientes

após clonagem. Uma vez definida qual a variação exata, faremos uma análise de segregação nas famílias afetadas recrutando o maior número possível de familiares afetados e não-afetados por câncer em cada uma delas. Finalmente será investigada a ocorrência de perda de heterozigosidade no tumor de alguns dos indivíduos portadores dessa variante.

Em relação ao primeiro objetivo específico, as famílias foram analisadas de acordo com critérios clínicos para as síndromes HBOC, SLF, SLF-*Like* e Lynch. A grande maioria das famílias (88,3%), preenchia critérios clínicos para outras síndromes. Este dado demonstra que estas famílias possuem um risco genético para outras síndromes hereditárias, e indicação para investigação molecular de outros genes, e que existe uma sobreposição fenotípica entre as diferentes síndromes hereditárias que envolvem câncer de mama e cólon.

Em relação ao segundo objetivo específico, foram realizados testes de predição de risco para mutações em *MLH1*, *MSH2*, *BRCA1* e *BRCA2* através de modelos disponíveis na literatura. Para os genes MMR associados à síndrome de Lynch, a probabilidade média estimada da amostra para mutações calculada através do modelo PREMM 1,2 foi de 7,3%. Para os genes *BRCA1* e *BRCA2*, relacionados à síndrome HBOC, e utilizando o modelo PENNII e as tabelas de frequência de mutação do Laboratório Myriad a probabilidade média estimada de mutação na amostra foi próxima de 15%. Concluimos que estas ferramentas podem auxiliar na indicação do teste molecular para confirmação de suspeita clínica de outras síndromes de predisposição ao câncer nestas famílias.

As técnicas de PCR e sequenciamento foram padronizadas, permitindo no futuro oferecer estas análises como apoio diagnóstico em nossa instituição.

Para os membros da família do indivíduo portador da mutação foi oferecido o teste molecular e aconselhamento genético. Em uma primeira etapa, o teste foi oferecido em sessão de aconselhamento genético aos filhos e irmãos da paciente portadora da mutação. Entre os dois filhos com idade acima de 18 anos, somente a filha optou por realizar o teste preditivo, sendo efetivamente identificada a mutação. Ela será agora encaminhada para um programa específico de rastreamento para câncer de mama e cólon. Nenhum dos irmãos/irmãs da paciente se mostrou interessado em realizar o teste genético no momento.

Em nosso estudo, concluímos que a frequência encontrada nesta amostra foi de 1,7%, e que devido a este dado, outras mutações em *CHEK2* e em outros genes devem ser analisados para tentar explicar o grande número de famílias com múltiplos diagnósticos de CM e CCR diagnosticados em idade jovem no Brasil.

7. PERSPECTIVAS

Investigações subseqüentes com as famílias estudadas aqui poderiam ser realizadas e incluem:

1) análise da mutação R337H no éxon 10 do gene *TP53* de todas as famílias pela recente associação de câncer de cólon ao fenótipo SLF/LFL em famílias brasileiras;

2) análise de mutações germinativas de *TP53* em famílias com critérios para SLF/LFL;

3) análise de mutações germinativas de *MLH1* e *MSH2* em famílias com critérios para a síndrome de Lynch;

4) análise de mutações germinativas de *BRCA1* e *BRCA 2* em famílias com critérios para a síndrome HBOC.

8. ANEXOS

8.1 Anexos Referidos na Revisão Bibliográfica

8.1.1 Critérios clínicos para a Síndrome de Predisposição ao Câncer de Mama e Ovário: ASCO e NCCN.

Critérios ASCO(American Cancer Society)

- Três ou mais casos de câncer de mama e um caso de câncer de ovário em qualquer idade ou;
- Mais de três casos de câncer de mama \leq 50 anos ou;
- Par de irmãs (ou mãe e filha) com um dos seguintes critérios (\leq 50 anos):
 - dois casos de câncer de mama; ou
 - dois casos de câncer de ovário; ou
 - Um caso de câncer de mama e 1 caso de câncer de ovário

Critérios NCCN (National Comprehensive Cancer Network)

Caso for familiar (ou seja se a paciente não tem câncer) usar “e/” antes do critério.

- Família com mutação detectada em *BRCA1* ou *BRCA2*
- História pessoal de câncer de mama associada a um ou mais dos seguintes:
 - diagnóstico antes dos 40 anos
 - diagnóstico antes dos 50 anos ou 2 tumores primários de mama (bilateral ou ipsilateral) associado com um ou mais casos de câncer de mama \leq 50 ou um caso de câncer de ovário
 - diagnóstico em qualquer idade, com 2 familiares próximos com câncer de mama e/ou ovário em qualquer idade
 - familiar do sexo masculino com câncer de mama
 - história pessoal de câncer de ovário
 - ascendência étnica associada a uma alta frequência de mutações deletérias (ex.ascendência Ashkenazi)
- História pessoal de câncer de ovário
- História pessoal de câncer de mama em homem particularmente se um ou mais dos seguintes:
 - familiar do sexo masculino com câncer de mama
 - familiar do sexo feminino com câncer de mama e/ou ovário.

8.1.2 Modelo de Probabilidade de mutação em *BRCA1* e *BRCA2* – Penn II




The Penn II Risk Model-

What is the Penn II Model?

- This model can be used to predict the pre-test probability, or prior probability, that a person has a *BRCA1* or *BRCA2* mutation. In general, individuals with at least a 5-10% chance of having a mutation in either gene are considered good candidates for genetic testing. This model does not predict breast cancer risk. It focuses only on the chance that an individual has inherited a mutation in *BRCA1* or *BRCA2*.

Instructions for use

1. Please answer the following questions.
2. Information from a single lineage in the family should be used and restricted to three generations.
3. If there is cancer history present on both the maternal and paternal sides, each lineage should be entered separately.
4. Since this model depends on the family history being accurate, attempts should be made to confirm the family history with pathology reports, especially for cases of ovarian cancer
5. Further information can be found by clicking the  icon

Part A. Select the Side of the Family in Question: Maternal Paternal

Part B. Please provide Following Information:

1. Presence of Ashkenazi Jewish ancestry? no yes
2. Number of women in family diagnosed with both breast and ovarian cancer? (0-100)
3. Number of individual women in family diagnosed with ovarian or fallopian tube cancer in the absence of breast cancer? (0-100)
4. Number of breast cancer cases in family diagnosed in individuals under the age of 50? (0-100)

5. What is the age of the youngest breast cancer case? (18-130)

6. Presence of mother-daughter breast cancer diagnosis in family? no yes

7. How many individuals with bilateral breast cancer in family? (0-100)

8. Number of male breast cancer diagnoses in family? (0-100)

9. Presence of pancreatic cancer in family? no yes

10. Number of prostate cancer diagnoses in family? (0-100)

Part C. Closest Relative with Breast or Ovarian Cancer: : Aunt/Uncle First Cousin

Grandparent/Grandson/Granddaughter

Sibling/Parent/Child

The

Patient/Proband Unknown

Part D. Patient Information (Optional- for use on report only):

1. Patient's first name

2. Patient's last name

3. Patient's age

4. Clinic location

8.1.3 Tabelas de Prevalência de Mutação do Laboratório Myriad

1. The Prevalence of Deleterious Mutations in BRCA1 and BRCA2 (Excludes Individuals of Ashkenazi Ancestry)						
	Family History (Includes at least one first or second degree relative)					
Patient's History	No breast cancer <50, or ovarian cancer, in any relative.†	Breast cancer <50 in one relative; no ovarian cancer in any relative.	Breast cancer <50 in more than one relative; no ovarian cancer in any relative.	Ovarian cancer at any age in one relative; no breast cancer <50 in any relative.	Ovarian cancer in more than one relative; no breast cancer <50 in any relative.	Breast cancer <50 and ovarian cancer at any age. ††
No breast cancer or ovarian cancer at any age	2.8%	4.5%	8.7%	5.6%	9.6%	12.2%
Breast cancer ≥ 50	2.9%	5.3%	11.4%	6.4%	12.2%	15.9%
Breast cancer <50	6.8%	15.8 %	30.1%	16.9%	27.3%	39.2%
Male breast cancer	12.8%	21.8%	41.9%	20.0%	40.0%*	61.9%
Ovarian cancer at any age, no breast cancer	8.8%	23.1%	42.3%	21.1%	33.2%	46.5%
Breast cancer ≥50 and ovarian cancer at any age	17.6%	26.1%	46.2%	30.3%	46.2%	60.0%
Breast cancer <50 and ovarian cancer at any age	39.1%	53.9%	67.2%	66.0%	70.8%	79.0%

† May include families with breast cancer ≥50 (in women or men).

Number of observations in Table 1 is 49149

†† Includes family members with either or both diagnoses.

*N<20

2. The Prevalence of Deleterious Mutations in BRCA1 and BRCA2 in Individuals of Ashkenazi Ancestry						
	Family History (Includes at least one first or second degree relative)					
Patient's History	No breast cancer <50, or ovarian cancer, in any relative.†	Breast cancer <50 in one relative; no ovarian cancer in any relative.	Breast cancer <50 in more than one relative; no ovarian cancer in any relative.	Ovarian cancer at any age in one relative; no breast cancer <50 in any relative.	Ovarian cancer in more than one relative; no breast cancer <50 in any relative.	Breast cancer <50 and ovarian cancer at any age. ††
No breast cancer or ovarian cancer at any age	6.9%	13.7%	19.9%	15.6%	23.6%	27.5%
Breast cancer ≥ 50	4.4%	9.4%	11.3%	15.8%	20.0%	19.9%
Breast cancer <50	12.0%	24.2%	38.3%	38.8%	59.2%	51.4%
Male breast cancer	15.0%	30.8%	0.0% *	40.0% *	100.0% *	70.0% *
Ovarian cancer at any age, no breast cancer	22.2%	37.0%	60.6%	42.0%	43.2%	72.3%
Breast cancer ≥50 and ovarian cancer at any age	29.5%	64.3% *	50.0% *	50.0% *	100.0% *	63.6% *
Breast cancer <50 and ovarian cancer at any age	71.1%	88.9% *	80.0% *	90.9% *	100.0%*	75.0% *

† May include families with breast cancer ≥50 (in women or men).

Number of observations in Table 2 is 15345

†† Includes family members with either or both diagnoses.

*N<20

Table 2 includes individuals that tested for MultiSite3, which may have been for a known mutation in the family

8.1.4 Critérios clínicos para a Síndrome de Li-Fraumeni: Clássicos, Birch, Eeles e Chompret.

Critérios Clássicos Li & Fraumeni et al., 1988

- Paciente índice diagnosticado com sarcoma antes dos 45 anos e
- Familiar de primeiro grau com câncer antes dos 45 anos e
- Familiar de primeiro ou segundo graus com qualquer tumor diagnosticado antes dos 45 anos ou com sarcoma em qualquer idade.

Critérios Birch (utilizados em famílias que não possuem critérios clássicos)

- Câncer na infância ou sarcoma, tumor do sistema nervoso central ou câncer adrenocortical antes dos 45 anos e
- Familiar de primeiro grau ou segundo grau com câncer típico da LFS (sarcoma, câncer de mama, tumor do sistema nervoso central, câncer adrenocortical ou leucemia) em qualquer idade e
- Familiar de primeiro ou segundo grau com qualquer câncer antes dos 60 anos.

Critérios Eeles

Eeles 1. Presença de dois familiares de primeiro ou segundo grau com câncer típico da LFS em qualquer idade (sarcoma, câncer de mama, tumor SNC, leucemia, câncer adrenocortical, melanoma, câncer de próstata, câncer pancreático).

Eeles 2. Sarcoma em qualquer idade no probando com dois dos seguintes tumores (podendo estar presentes no mesmo indivíduo) câncer de mama <50 anos e/ou câncer típico da LFS aos <60 anos ou sarcoma em qualquer idade.

Critérios Chompret

- Sarcoma, tumor do sistema nervoso central, câncer de mama ou câncer adrenocortical antes dos 36 anos e
 - Familiar de primeiro grau ou segundo grau com câncer antes dos 46 anos ou
 - Familiar com múltiplos tumores primários em qualquer idade
- (ou) Múltiplos tumores primários, incluindo dois tumores que sejam do tipo sarcoma, tumor do sistema nervoso central, câncer de mama ou câncer adrenocortical, com o primeiro tumor diagnosticado antes dos 36 anos, independente da história familiar.
- (ou) Câncer adrenocortical em qualquer idade e independente da história familiar.

8.1.5 Modelo de probabilidade de mutação nos genes *MLH1* e *MSH2* – PREMM 1,2.



Lynch Syndrome (Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer)

PREMM1,2 Model: Prediction Model for *MLH1* and *MSH2* Gene Mutations

The PREMM1,2 model is a clinical prediction rule designed to be used by healthcare professionals to estimate the probability that an individual carries a mutation in *MLH1* or *MSH2*. Mutations in these genes are found in most patients with the Lynch syndrome.

Proband Information ("*Proband*" refers to the individual being evaluated. Ideally, *this individual should have a cancer or adenoma diagnosis.*)

How many separate colorectal cancers has the proband had?

- None
- One
- Two or more

If one, what was the age at diagnosis?
(if unknown, estimate)

Has the proband had colonic adenoma(s)?

- Yes
- No

What was the youngest age at diagnosis?
(if unknown, estimate)

Has the proband had endometrial cancer?

- Yes
- No

What was the youngest age at diagnosis?
(if unknown, estimate)

Has the proband had another HNPCC-associated cancer?

- Yes
- No

(Other HNPCC-associated cancers include ovary, stomach, small intestine, urinary tract/kidney, bile ducts, glioblastoma multiforme, sebaceous gland tumors, and pancreas.)

Relatives Information - First Degree (Only from affected side of family)

How many first-degree relatives have had colorectal cancer?

- None
 One
 Two or more

If one, what was his/her age at diagnosis?

(if unknown, estimate)

If two or more, what was the youngest age at diagnosis?
(if unknown, estimate)

How many first-degree relatives have had endometrial cancer?

- None
 One
 Two or more

If one, what was her age at diagnosis?

(if unknown, estimate)

If two or more, what was the youngest age at diagnosis?
(if unknown, estimate)

Have any first-degree relatives had another HNPCC-associated cancer?

- Yes
 No

Relatives Information - Second Degree (Only from affected side of family)

How many second-degree relatives have had colorectal cancer?

- None
 One
 Two or more

If one, what was his/her age at diagnosis?

(if unknown, estimate)

If two or more, what was the youngest age at diagnosis?
(if unknown, estimate)

How many second-degree relatives have had endometrial cancer?

- None
 One
 Two or more

If one, what was her age at diagnosis?

(if unknown, estimate)

If two or more, what was the youngest age at diagnosis?
(if unknown, estimate)

Have any second-degree relatives had another HNPCC-associated cancer?

- Yes
 No

Calculate

Clear All

Predicted Probability of Mutation

If the Predicted Probability of Mutation is more than five percent, please consider a genetic evaluation for your patient. You may refer your patient to our Cancer Risk and Prevention Clinic, by calling (617) 632-2178 to schedule a clinic appointment. If you are not in the Boston area, please contact a cancer center nearest you, and they may be able to refer you to a genetics program in your area.

Additional Information

We developed the Prediction of *MLH1* and *MSH2* Mutations model (PREMM1,2) as a web-based tool for clinicians evaluating patients at risk for Lynch Syndrome. For those investigators who want to use the equation on which the model is presented, please consider the clarifications summarized in this table to ensure that the correct values are obtained, and/or check the results with those obtained with this excel spreadsheet.

8.1.6 Critérios clínicos para a Síndrome de Lynch: Amsterdam (I), Amsterdam (II), Bethesda e Bethesda Modificado.

Critérios de Amsterdam (I)

- Pelo menos 3 membros da família afetados por CCR:
 - Um dos afetados deve ser parente em primeiro grau dos outros dois.
 - Pelo menos duas gerações sucessivas devem ser afetadas.
 - Pelo menos um tumor deve ser diagnosticado antes dos 50 anos de idade.
 - O diagnóstico de Polipose Adenomatosa Familiar deve ser excluído.
 - Os tumores devem ser verificados através de exame histopatológico.

Critérios Modificados de Amsterdam (II)

- Pelo menos 3 membros da família afetados por CCR ou tumor associado a síndrome de Lynch: câncer de endométrio, intestino delgado, ureter ou pélvis renal.
 - Um dos afetados deve ser parente em primeiro grau dos outros dois.
 - Pelo menos duas gerações sucessivas devem ser afetadas.
 - Pelo menos um tumor deve ser diagnosticado antes dos 50 anos de idade.
 - O diagnóstico de Polipose Adenomatosa Familiar deve ser excluído.
 - Os tumores devem ser verificados através de exame histopatológico.

Critérios de Bethesda

- Indivíduos com dois tumores do espectro Lynch incluindo: CCR sincrônico ou metacrônico, ou câncer extracolônico (endométrio, intestino delgado, de células transicionais de pélvis renal ou ureter).
- Indivíduos com CCR e um parente em primeiro grau com CCR e/ou câncer extracolônico do espectro Lynch e/ou adenoma colorretal; um dos casos de câncer diagnosticado antes dos 45 anos de idade, e o adenoma diagnosticado antes dos 40 anos de idade.
- Indivíduos com CCR ou CE diagnosticado antes dos 45 anos de idade.
- Indivíduos com CCR no cólon direito com padrão histopatológico indiferenciado diagnosticado antes dos 45 anos de idade.
- Indivíduos com CCR e tipo celular em anéis de sinete, diagnosticado antes dos 45 anos de idade.
- Indivíduos com adenoma diagnosticados antes dos 45 anos de idade.

Critérios de Bethesda Modificados

- Indivíduos com diagnóstico de CCR antes dos 50 anos de idade.
- Presença de tumores sincrônicos ou metacrônicos colorretais ou do espectro Lynch (endométrio, estômago, ovários, pâncreas, ureter, pélvis renal, trato biliar, tumores cerebrais, adenomas das glândulas sebáceas, ceratoacantomas da Síndrome Muir-Torre e carcinoma do intestino delgado), independente da idade ao diagnóstico.
- Indivíduos com CCR com histologia IMS-H* diagnosticado antes dos 60 anos de idade.
- Indivíduos com CCR com um ou mais parentes em primeiro grau com tumor do espectro Lynch, sendo um dos casos diagnosticado antes dos 50 anos de idade.
- Indivíduos com CCR e dois ou mais parentes em primeiro ou segundo grau com tumor do espectro Lynch, independente da idade.

*Alta instabilidade de microssatélites

8.1.7 Critérios clínicos para a Síndrome de Predisposição Hereditária ao Câncer de Mama e Cólon de acordo com os seguintes autores: Abajo et al., Meijers-Heijboer et al. e Nasseem et al.

Abajo et al. (2005)

Preencher um dos critérios abaixo e pelo menos um dos critérios adicionais:

1. Dois parentes em primeiro grau com câncer de mama diagnosticados antes dos 50 anos; ou
2. Uma mulher com câncer de mama e ovário concomitantes; ou
3. Uma mulher com câncer de mama bilateral; ou
4. Uma mulher com diagnóstico de câncer de mama antes dos 35 anos.

Critérios adicionais:

1. Um indivíduo com diagnóstico de câncer colorretal antes dos 50 anos; ou
2. Dois parentes em primeiro grau com câncer colorretal em qualquer idade; ou
3. Uma mulher com diagnóstico de câncer de mama e colorretal concomitantemente

Meijers-Heijboer et al. (2003)

Pelo menos dois indivíduos com câncer de mama, familiares de 1º ou 2º grau com pelo menos um diagnóstico < 60 anos e, adicionalmente:

1. Pelo menos um indivíduo com câncer de mama e de cólon diagnosticados em qualquer idade; ou
2. Pelo menos um indivíduo com câncer colorretal < 50 anos, familiares de 1º ou 2º grau de um indivíduo com câncer de mama; ou
3. Pelo menos dois indivíduos com câncer colorretal diagnosticados em qualquer idade e pelo menos um familiar de 1º ou 2º grau com câncer de mama.

Nasseem et al. (2006)

1. Pelo menos um paciente com câncer de mama e câncer colorretal diagnosticados em qualquer idade, e um caso adicional de câncer de mama ou câncer colorretal em um familiar de 1º ou 2º grau; ou

2. Pelo menos um paciente com câncer colorretal < 50 anos, com um familiar de 1º ou 2º grau com câncer de mama < 50 anos ou com pelo menos dois familiares 1º ou 2º grau com câncer de mama; ou

3. Pelo menos dois pacientes com câncer colorretal diagnosticados em qualquer idade, com pelo menos um familiar de 1º ou 2º grau diagnosticado com câncer de mama < 50 anos ou com pelo menos dois familiares de 1º ou 2º grau diagnosticados com câncer de mama.

8.2 Protocolos e Documentos

8.2.1 Protocolo de extração de DNA

Protocolo Extração de DNA pelo Método d Puregene

Reagentes:

Solução de Lise RBC	5 mM MgCl ₂ 1 mM EDTA pH 8,0
Solução de Lise Celular	10 mM Tris pH 7,5 1 mM EDTA pH 8,0 1% SDS
Solução de Precipitação de Proteína	7,5 M NH ₄ Ac
Outros Agentes Utilizados	Isopropanol 100% Etanol 70% Tampão TE 1X
RBC	0,5 ml - MgCl ₂ 1 M 0,2 ml - EDTA 0,5 M dH ₂ O - qsp 100 ml
CLS	1 ml - Tris 1 M 0,2 ml - EDTA 0,5 M 10 ml - SDS 10% dH ₂ O - qsp 100

Etapa 1 – Lise Celular

1-Adicionar 3 ml de sangue total a um tubo *falcon* de 15 ml contendo 9 ml da solução de lise RBC. Inverter o tubo e incubar a temperatura ambiente por 10 minutos. Inverter pelo menos uma vez mais durante a incubação;

2-Centrifugar por 10 minutos a 3400 rpm (2000g). Remover o sobrenadante deixando um pellet visível de células brancas e 100-200 ul de líquido residual;

3-Vortexar o tubo vigorosamente para ressuspender as células brancas no supernadante residual, o que facilita em muito a lise na etapa seguinte;

4-Adicionar 3 ml da solução de lise celular ao tubo contendo as células ressuspendidas e misturar com pipeta de transferência diversas vezes até a solução ficar homogênea. Após misturar, nenhum resíduo celular (ou aglomerado de células) deve ser visível. Se houverem resíduos, incubar a 37°C até a solução ficar homogênea. A amostra é estável se armazenada nessa solução a temperatura ambiente por 18 meses;

Etapa 2 – Precipitação da Proteína

- 1-Resfriar a amostra até a temperatura ambiente;
- 2-Adicionar 1 ml da solução de precipitação de proteína ao lisado celular;
- 3-Vortexar vigorosamente por 20 segundos para misturar a solução uniformemente com o lisado celular;
- 4-Centrifugar a 3400 rpm por 10 minutos. As proteínas precipitadas formarão um pellet marrom escuro e compacto;

Etapa 3 – Precipitação do DNA

- 1-Transferir o sobrenadante contendo o DNA para um tubo *falcon* de 15 ml contendo 3 ml de isopropanol 100%;
- 2-Inverter o tubo lentamente cerca de 50 vezes até que apareçam os “novelos” de DNA;
- 3-Centrifugar a 3400 rpm por 3 minutos, o DNA será visível como um pellet branco pequeno;
- 4- Retirar o sobrenadante e drenar o tubo em papel absorvente. Adicionar 3 ml de etanol 70%. Inverter o tubo várias vezes para lavar o pellet de DNA;
- 5-Centrifugar a 3400 rpm por 1 minuto. Retirar o sobrenadante cuidadosamente. O pellet poderá estar solto, por isso é preciso inverter o tubo lenta e cuidadosamente para não perdê-lo;
- 6-Drenar o tubo em papel absorvente e deixar a amostra “secar” a temperatura ambiente por 15 minutos;

Etapa 4 – Precipitação da Proteína

- 1-Adicionar 200-250 μ l de tampão TE 1X que resulta em uma concentração aproximada de 400 μ g/ μ l. Deixar o DNA hidratar neste tampão a temperatura ambiente por 12-24 horas ou alternativamente, incubar o DNA a 65° C por 1 hora;
- 2-Armazenar o DNA a 2-8° C;

8.2.2 Protocolo da quantificação do DNA: Qubit® Invitrogen (Fluorômetro)

1) Mix

*1ul Quantit TM (Reagente fluorescente)

* 199ul de Buffer

Reagentes contidos no Kit.

2)Após, pipetar 198ul do mix preparado e 2ul do DNA extraído.

Realizar leitura no equipamento Qubit®.

Obs: Quantidades para uma amostra.

8.2.3 Primers utilizados para a amplificação do exon 10

PCR Longo F3

5'- TTAAAGCCAGAGAATGTTTTACTGTCATCTCAAG -3'

PCR Longo R3

5'- TCAACTAAAGAACCGATTATCAAGCAGAAGCACAAAG-3'

Nested PCR F2

5'- ATAACAGGAAACAGCTATGACCAACTTGCAAAGACATGAATCTG-3'

Nested PCR R1

5'- GCAAGACACATTTGTGACTTC-3'

8.2.4 Protocolo do PCR de longo alcance

A) CONDIÇÕES DO PCR

PCR LONGO

1) Passo 1: Mix 1 do pcr longo (conforme protocolo)

<u>Condições</u> 2' → 94°C 30'' → 80°C
--

2) Pause

3) Passo 2: Mix 2 do pcr longo (conforme protocolo)

<u>Condições</u> 10'' → 94°C 30'' → 64°C 10' → 68°C
--

Obs: Repetir 10 vezes as condições do passo 2.

4) Passo 3

<u>Condições</u> 10'' → 94°C 30'' → 64°C 10' 20'' → 68°C

Obs: Repetir 20 vezes o passo 3

5) Passo 4 : 17' → 68°C

Hold: 10°C

NESTED PCR

1) Mix nested primeira parte (conforme protocolo)
Condições: 2' → 94°C

2)Pause

3)Passo1: Mix nested segunda parte(conforme protocolo)

<u>Condições</u> 30" → 94°C 1' → 64°C 1' → 72°C
--

Obs: repetir 34 vezes o passo 1.

4)Passo2:

<u>Condições</u> 5' → 72°C 10" → 25°C

B) PROTOCOLO PCR LONGO *CHEK2*

Programa termociclador: *CHEK2*

Volumes modificados no nested para um volume final de 50µl

PCR Longo

Mix1

*dntp: 0,875 µl

*primer F3: 0,375 µl

*primer R3: 0,375µ

*H₂O: 7,875µl

**9,5µl por tubo + 3,0µl DNA (20ng)

**abrir a máquina depois de 2'

Mix 2

*tampão A: 1,0µl

*tampão B: 3,1µl

*elongase: 0,83µl

* H₂O: 7,6µl

**12,5µl em cada tubo do mix1

**tempo duração: 6 horas

**diluir produto de Pcr Longo 1:10

PCR Nested

Mix 1

*tampão 10X:3,33µl

*MgCl₂: 3,0µl

*dntp: 1,0µl

*primer F2: 2,50µl

*primer R1: 2,50µl

*lote:17,67µl

**30µl por tubo + 1µl do produto pcr longo diluído

Mix 2

*tampão10x: 1,67µl

*lote: 15,0µl

*taq platinum: 1,67µl

**16,67µl em cada tubo do mix 1 nested

Produtos:

→Pcr longo: 920pb

→Nested: 416pb

Gel agarose 0.8%:

*100ml TBE 1x

*0,8g agarose comum/ 9,0µl de brometo de etídio

* ~ 83V, 1hora

*4µl pcr + corante(BFB)

*marcador: 4µl

Marcador: _____

OBS/Comentários gel:

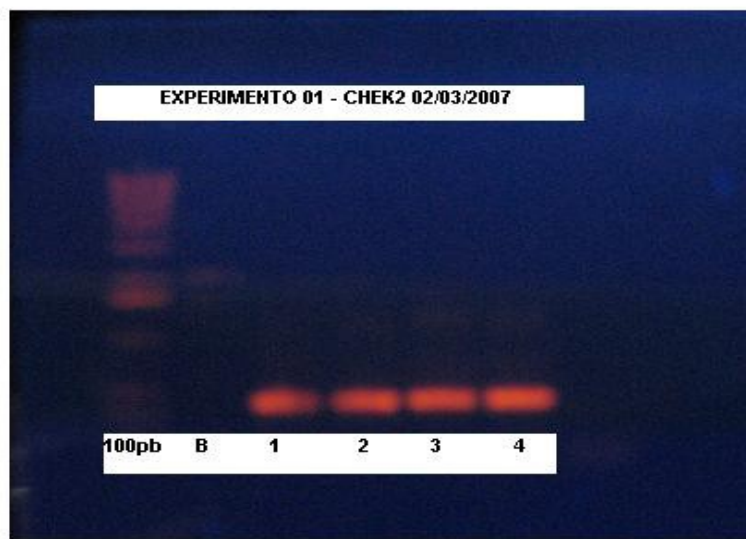


Figura 5: Eletroforese horizontal em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio mostrando a amplificação da região de interesse (100pb: marcador de peso molecular; B: branco; 1-4: amostras).

8.2.5 Protocolo de quantificação do PCR

A quantificação dos produtos de PCR foram realizadas comparativamente com o marcador molecular *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen), em eletroforese horizontal em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio e visualizado em transluminador de raios UV.

8.2.6 Protocolo de Sequenciamento dos PCR(s)

Utilizamos o protocolo de purificação do Kit GFX da GE (GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit) para purificação de produtos de PCR. Para o sequenciamento utilizamos o Kit Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit da Applied Biosystems.

- 1) Distribuir as amostras de DNA, os respectivos primers e água milliQ (quando necessário) na placa de 96 poços, perfazendo um volume final 7,5 µL por poço;
- 2) Calcular, de acordo com o número de placas, e preparar a mistura de reação para a reação de sequenciamento de DNA. A mistura de reação para uma placa é formada por: 100 µL de BigDye (Applied Biosystems) e 150 µL de tampão de sequenciamento 5x (Applied Biosystems);
- 3) Adicionar 2,5 µL da mistura de reação em cada poço da placa;
- 4) Colocar a placa no termociclador e acionar o protocolo de sequenciamento, o qual apresenta a seguinte ciclagem: 94°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos; com 40 repetições desse mesmo ciclo. A placa de amostras pode ser estocada a -20°C por no máximo 03 (três) meses;
- 5) Após a reação de sequenciamento é feita uma precipitação das amostras para retirada de ddNTPs livres que podem interferir na leitura da sequência de DNA no analisador de DNA.
- 6) Após ciclagem da reação de sequenciamento, os produtos presentes na placa deverão passar pelo processo de precipitação. Este consiste em:
 - 6.1) Centrifugar brevemente (spin) a placa contendo os produtos da ciclagem;
 - 6.2) Adicionar 30 µL de Isopropanol 75% em cada poço da placa;
 - 6.3) Vortexar a placa por 10 segundos;
 - 6.4) Manter a placa em repouso, por 15 minutos, sob abrigo da luz;
 - 6.5) Centrifugar, por 45 minutos, a 4.000 rpm;
 - 6.6) Descartar sobrenadante usando papel-toalha. Verter a placa sobre o papel-toalha e, através de movimentos circulares apoiada sobre uma bancada, descartar o sobrenadante;
 - 6.7) Adicionar 50 µL de Etanol 75% em cada poço da placa;
 - 6.8) Centrifugar, por 15 minutos, a 4.000 rpm;
 - 6.9) Descartar sobrenadante usando papel-toalha, de acordo com o descrito anteriormente;
 - 6.10) Centrifugar a placa invertida ("spin down"). Utilizar novamente o papel-toalha, invertendo a placa nele, porém levando-a para uma breve centrifugação, deixando chegar até 600 rpm e interrompa a centrifugação;

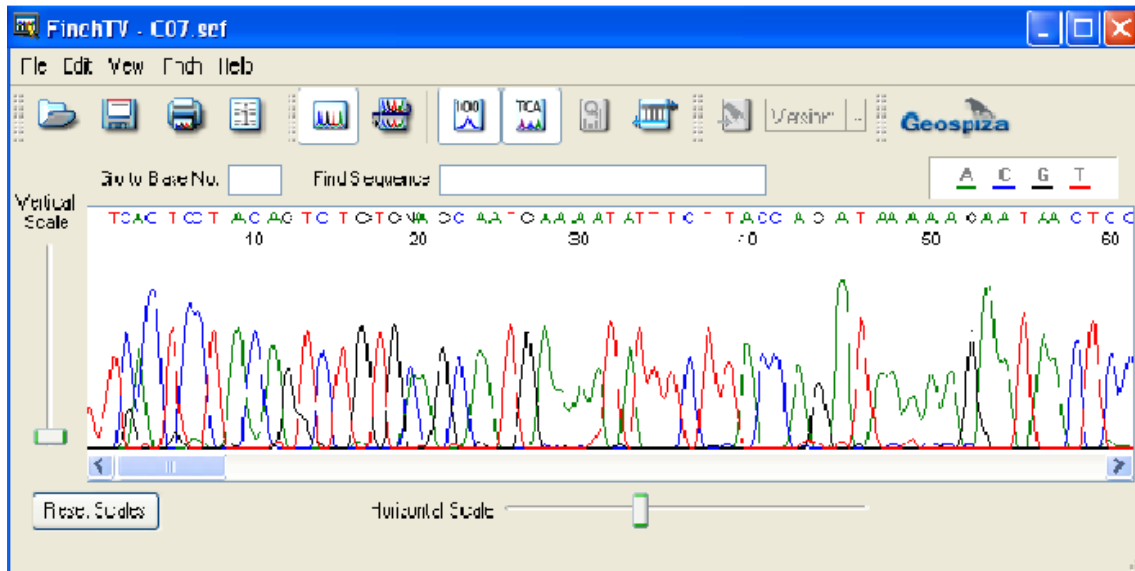
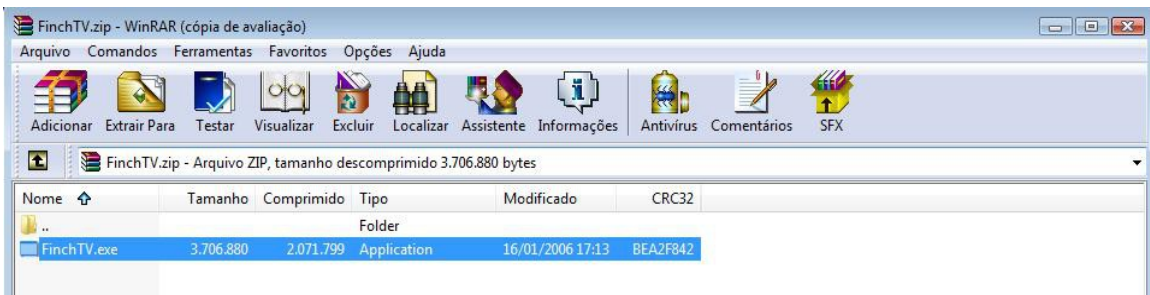
6.11) Colocar a placa em um bloco aquecido a 60°C, permanecendo por 10 minutos, sob abrigo da luz;
Armazenar a placa, sob abrigo da luz, a -20°C, pelo tempo máximo de 1 mês, aproximadamente.

Após o processo de precipitação, os produtos de sequenciamentos devem ser preparados para serem submetidos à eletroforese no sequenciador. Para tal procedimento, a desnaturação, utiliza-se a formamida, fator este altamente desnaturante que permite a separação da dupla-fita de DNA que irá ser analisada no sequenciador automático capilar. Este processo consiste em:

- 7) Adicionar 10 µL de formamida em cada poço da placa seca;
- 8) Centrifugar brevemente para permitir o preenchimento correto de cada poço;
- 9) Colocar a placa em um bloco aquecido a 95°C, permanecendo por 3 minutos, sob abrigo da luz;
- 10) Logo após o término do aquecimento, colocar a placa num recipiente com gelo, temperatura próxima a 4°C, e lá permanecer por 5 a 10 minutos;
- 11) Centrifugar brevemente para permitir que os produtos aderidos às paredes dos tubos dos poços concentrem-se ao fundo.

Levar a placa para eletroforese. Caso a placa não seja submetida à eletroforese logo após o processo de desnaturação amostras poderão ser armazenadas a 4°C por 5 dias, no máximo.

8.2.7 Software utilizado para interpretação dos sequenciamentos



8.2.8 TCLE –Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aprovado pelo GPPG sob o numero 07-076

ANEXO 2 – TCLE PROJETO 07-076

IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DE ALTERAÇÕES EM GENE DE PREDISPOSIÇÃO HEREDITÁRIA AO CÂNCER DE MAMA E CÓLON.

INVESTIGADORES: Jamile Abud, Ingrid Petroni Ewald, Sílvia Liliana Cossio, Fernando Vargas, Miguel Ângelo Moreira, Maria Isabel W. Achatz, Edenir Inêz Palmero, Patrícia Koehler Santos, Patrícia Ashton-Prolia, Hector Yuri Conti Wanderley, Joao Carlos Prolia.

Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Hospital do Câncer A. C. Camargo, Instituto Nacional do Câncer .

Telefone para contato: (51) 2101 8011/7661 em Porto Alegre

(11) 38890124 em São Paulo

(21) 32331469 no Rio de Janeiro

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

OBJETIVO:

Você está sendo convidado a participar de um projeto de pesquisa que vai estudar alterações genéticas no gene *CHEK2* que podem causar maior risco para câncer de mama e de cólon. Estão sendo selecionadas para este estudo famílias que tenham pessoas diagnosticadas com câncer de mama e/ou cólon e que preenchem alguns critérios especiais em termos do número de casos de câncer na família e idade ao diagnóstico de câncer.

PROCEDIMENTOS QUE SERÃO UTILIZADOS:

O estudo envolve pelo menos uma consulta de aconselhamento genético (AG), leitura e assinatura do termo de consentimento, coleta de sangue e teste genético. A sua participação nesse estudo é voluntária e não vai influenciar ou modificar seu acesso a tratamento médico agora ou no futuro. Como esse é um projeto de pesquisa e o exame não será realizado em um laboratório comercial, o prazo para entrega dos exames será ao final do projeto em aproximadamente dois (02) anos. Em caso de qualquer modificação nos prazos ou intercorrências na pesquisa, você será informado(a). Não há garantia absoluta de resultado conclusivo (o resultado do teste poderá ser inconclusivo por material insuficiente ou inadequado, por exemplo). Porém, todo esforço será feito para que o resultado seja liberado dentro do prazo estipulado. O teste genético requer a coleta de 10 ml de sangue do paciente para estudo de

HCPA / GPPG
VERSÃO ANTIGA DA

10/04/07
x 07076

05 ABR 2007

07076

alterações genéticas em genes de predisposição e em algumas vezes, poderá ser necessário repetir essa coleta. Você tem a opção de não querer receber ou retardar o recebimento dos resultados da análise genética durante qualquer momento do processo de testagem.

Se você decidir que quer saber o resultado do teste, este será preferencialmente disponibilizado a você, em uma consulta de aconselhamento genético no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. O resultado não será transmitido por telefone, fax ou carta. Você poderá trazer um ou mais familiares na ocasião se assim desejar. Em caso de impossibilidade de vir pessoalmente para receber o resultado do teste genético, você tem a opção de indicar, antecipadamente, uma pessoa para fazê-lo em seu lugar. Durante o aconselhamento vão lhe explicar que há três resultados possíveis para o teste:

- 1) Você pode ter herdado essa alteração no gene CHEK2 de predisposição ao câncer de mama e cólon. Com isso, você poderá descobrir que tem um risco aumentado de ter um segundo câncer, do mesmo tipo, ou de um tipo diferente do que já teve;
- 2) Você pode não ter herdado essa alteração no gene CHEK2 de predisposição ao câncer de mama e cólon. Com isso, podemos chegar à conclusão que essa alteração não explica sua história pessoal e familiar de câncer. Ainda assim, é possível que você tenha herdado uma outra alteração em CHEK2 ou uma alteração em um outro gene de predisposição para a qual não foi testada;
- 3) Pode ser impossível determinar se você herdou ou não um gene de predisposição alterado (teste inconclusivo).

COMPLICAÇÕES E RISCOS ESPERADOS:

Normalmente há riscos mínimos envolvidos na coleta de uma amostra de sangue, que incluem dor local, sangramento, hematoma e infecção. Os riscos deste estudo são principalmente de origem psicológica para aqueles participantes que desejarem saber o resultado. Saber que você tem maior risco de desenvolver certos tipos de câncer por ter uma alteração genética poderia causar depressão, ansiedade, raiva e medo do futuro. O aconselhamento genético tem o objetivo de ajudá-lo(a) a ajustar e lidar com a informação recebida.

A Síndrome de Câncer de Mama e Cólon Hereditários (HBC) é uma síndrome hereditária de predisposição ao câncer, que aumenta as chances de desenvolvimento

RECDA / GENE
VERMÃO AVALIADA
10/04/07

de câncer de mama e cólon predominantemente. O risco aparenta ser maior em mulheres, devido ao alto risco de desenvolvimento de câncer de mama, mas homens, podem ter câncer de cólon. Esses tumores podem ser rastreados e encontrados em estágios iniciais e muitas vezes menos invasivos. O teste genético, nesse caso, visa identificar quem tem maior risco e quem pode se beneficiar de condutas de prevenção, seja em relação a mudança de hábitos de vida, seja com um acompanhamento mais rigoroso, na tentativa de identificar lesões em estágios iniciais.

BENEFÍCIOS QUE PODERÃO SER OBTIDOS:

Este estudo permite o diagnóstico molecular de uma mutação já associada previamente a maior risco para câncer de mama e cólon. Uma vez identificada esta mutação, o diagnóstico em demais familiares assintomáticos pode ser realizado, acompanhado de aconselhamento genético das famílias acometidas. A realização do teste possibilita identificar pessoas em risco e encaminhá-las para programas mais intensivos de prevenção, diminuindo desta forma os danos causados pelo tumor devido ao diagnóstico e tratamento precoce. A descoberta de alterações nos genes de predisposição e a comparação com alterações previamente descritas possibilitarão uma melhor compreensão dos mecanismos da doença e o desenvolvimento de estratégias de rastreamento mais eficazes.

ECBA / GFTC
VERSÃO APTC 1.0
10/04/07
v07076

DOCUMENTAÇÃO DE CONSENTIMENTO:

1. Declaro ter sido esclarecido sobre a garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento sobre procedimentos, riscos, benefícios ligados à pesquisa e ao tratamento e que serei informado quanto ao desenvolvimento de novos exames relacionados.

SIM

NÃO

2. Declaro estar ciente de meu direito de retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isso traga prejuízo a continuidade de meu tratamento.

SIM

NÃO

3. Declaro ter sido esclarecido que não receberei nenhum tipo de remuneração financeira.

SIM

NÃO

4. Declaro ter sido esclarecido sobre a segurança de que minha identidade será preservada e que todas as informações por mim fornecidas serão confidenciais.

SIM

NÃO

5. Autorizo o armazenamento de minha amostra do meu DNA, obtida nesse projeto de pesquisa para utilização futura em projetos de pesquisa sobre o risco para câncer de mama, cólon e outros tumores. Neste caso, entendo que os pesquisadores farão novo contato comigo para explicação e autorização para realização desta nova pesquisa.

SIM

NÃO

6. Declaro estar ciente de que poderei optar por não saber o resultado do teste quando este estiver disponível.

SIM

NÃO

7. Entendo que o resultado deste teste genético será preferentemente entregue a mim. Em caso de impossibilidade de receber o resultado pessoalmente, autorizo outra pessoa a recebê-lo.

SIM

NÃO

Em caso afirmativo indique o nome e telefone desta pessoa _____

10/04/07
207070

8. Documentação de consentimento

Eu expliquei a _____ os objetivos e procedimentos necessários para este teste genético e os possíveis riscos e benefícios na minha melhor capacidade.

Assinatura Nome por extenso Data

Eu li e recebi uma cópia deste formulário de consentimento. Eu concordo em realizar a análise genética e aceito os riscos. Eu entendo a informação fornecida por este documento e eu tive a oportunidade de fazer perguntas e esclarecer dúvidas que eu tinha sobre o teste, o procedimento, os riscos associados e as alternativas.

Participante Data Data de nascimento

Testemunha Data

RECEBIDO
VITÓRIA 10/04/07
10/04/07
207076

8.2.9 FICHA CLÍNICA CÂNCER DE MAMA E CÓLON HEREDITÁRIO (HBCC)

IDENTIFICAÇÃO

GGC: _____ TCLE: _____

1. Data: ___/___/___

2.FAMÍLIA

No.: _____

3. Nome completo:

(letra de forma e legível, exatamente como consta na carteira de identidade)

4. No. Prontuário: _____

5.

Instit.:

6. Nome de

família

materno:

7. Nome de

de

família

paterno: _____

8. Endereço: _____

9. Telefone:

10. Município: _____

11. Estado:

12. CEP: _____

13.

Contato

(tel): _____

14. Data de nascimento: ___/___/___

15. Idade: _____ anos

16. Sexo: 1. Masc 2. Fem

17. Etnia: _____

18. Peso: _____ kg

19. Altura: _____ cm

20. Naturalidade: _____

21. Estado: _____

22. Escolaridade : 1. Analfabeto 2. Prim. incompl 3. Prim. completo 4. Secund. Incompl

5. Secund completo 6. Sup incompleto 7. Sup completo

23. Ocupação: A _____

B _____

24. Estado civil: 1. Solteiro(a) 2. Casado(a) 3. Viúvo(a) 4. Separado(a)

5. Outro: _____

25. Encaminhado(a) por: Dr.(a)

26. Local de origem: 1. Amb risco HSR 2. Amb Onco HSR 3. Amb Cir HSR

4. Outro Hospital 5. Outro: _____

DIAGNÓSTICO

27. Caso: 1. Portador de ca. de cólon 2. Portador de ca. de mama
 3. Portador de outro ca 4. Familiar com ca de cólon
 5. Familiar com ca de mama 6. Familiar com outro ca:

28. Médico e /ou instituição onde foi feito o diagnóstico:

29. Data do diagnóstico: ___/___/___

30. Localização: _____

31. Idade ao diagnóstico: ___anos

32. Tipo histológico:

33. Estágio: T _____ N _____ M _____

Número AP: _____

Data AP: _____

Laboratório: _____

Laudo: _____

34. Acompanhantes: 1. Sim 2. Não

35. Quem? 1. Mãe 2. Pai 3. Irmão/Irmã 4. Tio/tia
 5. Cônjuge 6. Amigo(a) 7. Outro

36. HDA: _____

37. HMP: _____

38. HCP: _____

RASTREAMENTO PARA CÂNCER: Realiza atualmente:

39. Sangue oculto nas fezes 1. Sim 2. Não Periodicidade: _____

40. EGD 1. Sim 2. Não Periodicidade: _____

41. Colonoscopia 1. Sim 2. Não Periodicidade: _____

42. Retossigmoidoscopia 1. Sim 2. Não Periodicidade: _____

43. Exame clínico 1. Sim 2. Não Periodicidade: _____
44. Mamografia: 1. Sim 2. Não Periodicidade: _____
45. Auto-exame de mamas: 1. Sim 2. Não Periodicidade: _____

HISTÓRIA MASTOLÓGICA

46. Idade na 1a. mamografia: _____ anos
47. No. total de mamografias: _____
48. Doença benigna da mama? 1. Sim 2. Não
49. Tipo: _____
50. Biópsias de mama? 1. Sim 2. Não
51. Número de biópsias: _____

FATORES DE RISCO PARA CÂNCER DE CÓLON

52. História familiar de CCR 1. Sim 2. Não
53. Doença inflamatória intestinal 1. Sim 2. Não
54. Dieta rica em gorduras e pobre em fibras 1. Sim 2. Não
55. História pessoal de adenomas ou CCR 1. Sim 2. Não

FATORES DE RISCO PARA CÂNCER DE MAMA

56. História familiar de ca de mama 1. Sim 2. Não
57. Biópsias mamárias prévias 1. Sim 2. Não
58. Hiperplasia atípica da mama 1. Sim 2. Não
59. Uso de hormônios (TRH OU ACO) 1. Sim 2. Não
70. Consumo de Álcool: 1. Sim 2. Não
71. Tipo: 1. Cerveja 2. Vinho 3. Destilados
72. Volume: _____ copos/doses
73. Frequência: 1. Diário 2. Semanal 3. Mensal 4. Anual
74. Fumo: 1. Sim 2. Não 77. Há: _____ anos
75. No. cigarros/dia: _____

DADOS RESUMIDOS DA HISTÓRIA FAMILIAR

76. Consangüinidade: 1. Sim 2. Não
77. Número casos de ca de cólon na família: _____ Confirmados: _____
78. Número casos de ca de cólon < 50 anos: _____ Confirmados: _____
79. Idade média dx casos de ca cólon (anos): _____ (excluindo casos sem idade determinada)
80. Número casos de ca de mama na família: _____ Confirmados: _____

81. Número casos de ca de mama < 50 anos: _____ Confirmados: _____
82. Idade média dx casos de ca mama (anos): _____ (excluindo casos sem idade determinada)

83. Outros tumores : 1. Sim 2. Não

84. Outros tumores tipo/N: 1. Endométrio 2. Ovário 3. Pâncreas

4. Vias urinárias 5. Gástrico 6. Pele 7. SNC

8. Outro

85. Preenche critérios de Amsterdam ? 1. Sim 2. Não

86. Preenche critérios de Bethesda ? 1. Sim 2. Não

87. Sugere: 1. HNPCC 2. Muir–Torre 3. Turcot

88. Preenche critérios de HBOC? 1. Sim 2. Não

() ASCO () Myriad _____ % () Penn II _____ %

Outro(s) critério(s)?

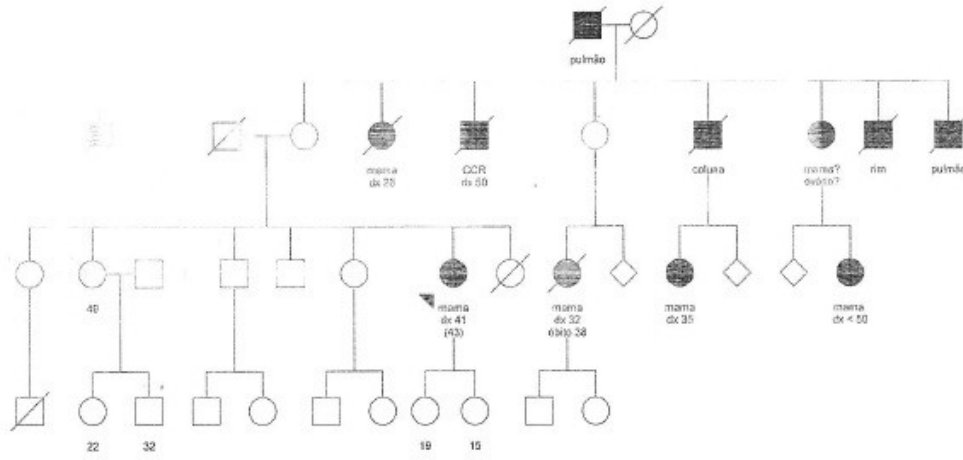
Probabilidade de Mutação:

HNPCC: _____ PREMM 1,2: _____ % PROMMR: _____ %

HBOC: _____ MYRIAD: _____ % PENN II: _____ %

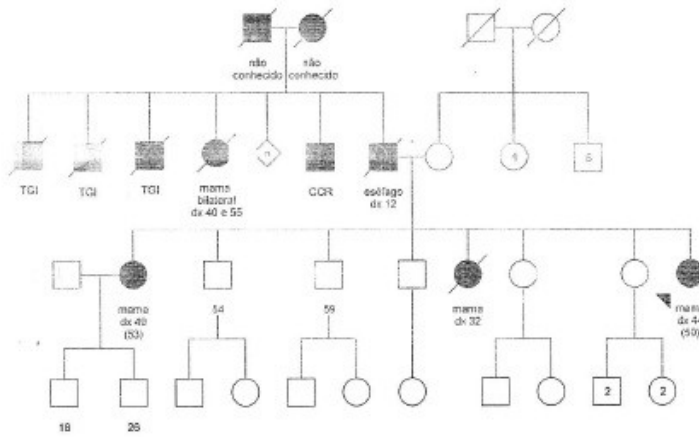
GGC 784
16/07/2009

■ Affected? = sim



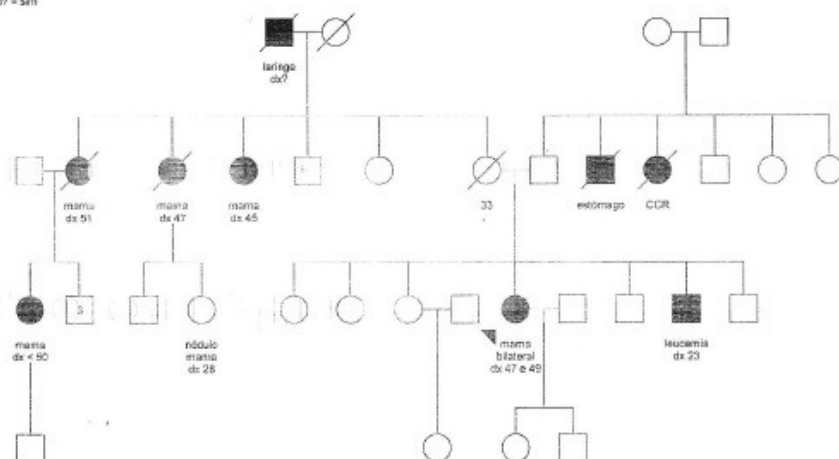
GGC 785
16/07/2009

■ Affected? = sim



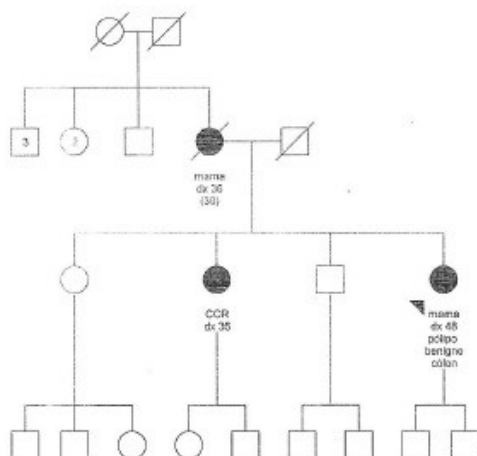
GGC 801
16/07/2009

■ Affected? = sim



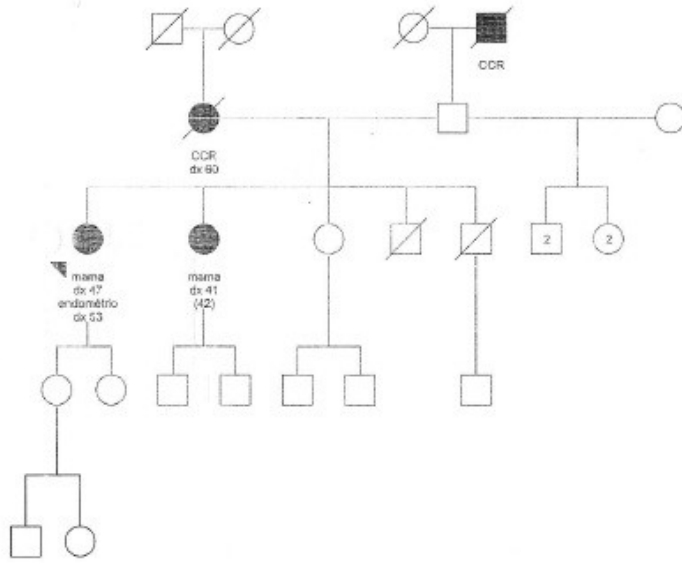
GGC 832
16/07/2009

■ Affected? = sim



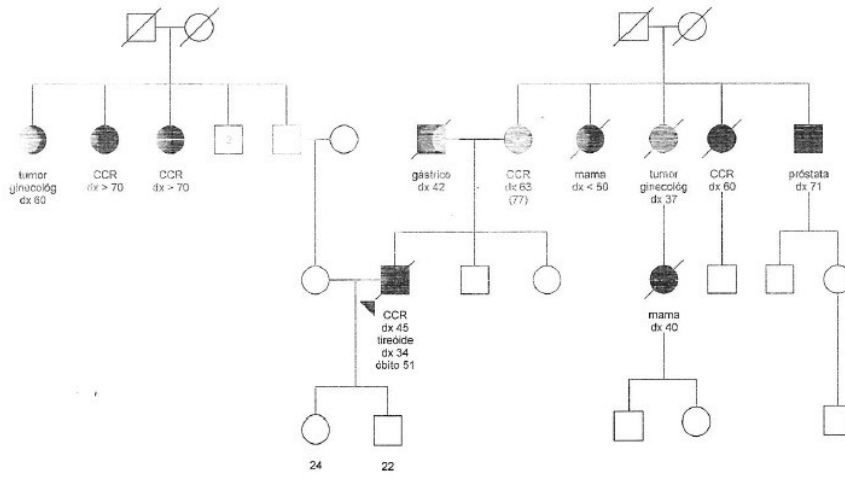
GGC 833
16/07/2009

Affected? = sim



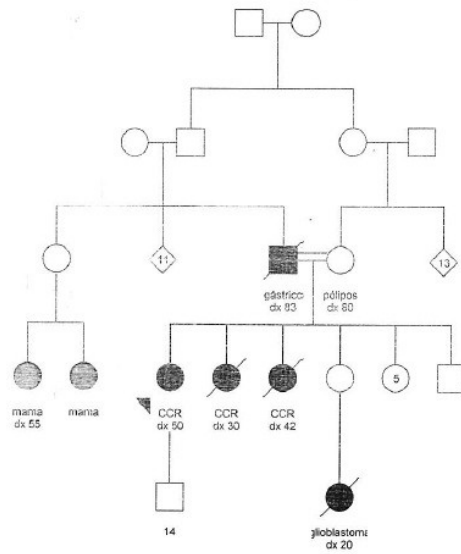
GGC 869
16/07/2009

Affected? = sim



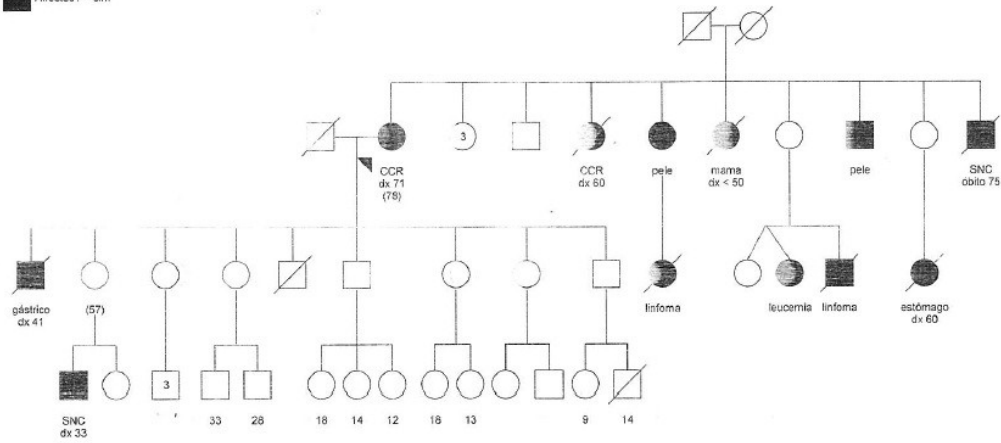
GGC 873
16/07/2009

■ Affected? = sim

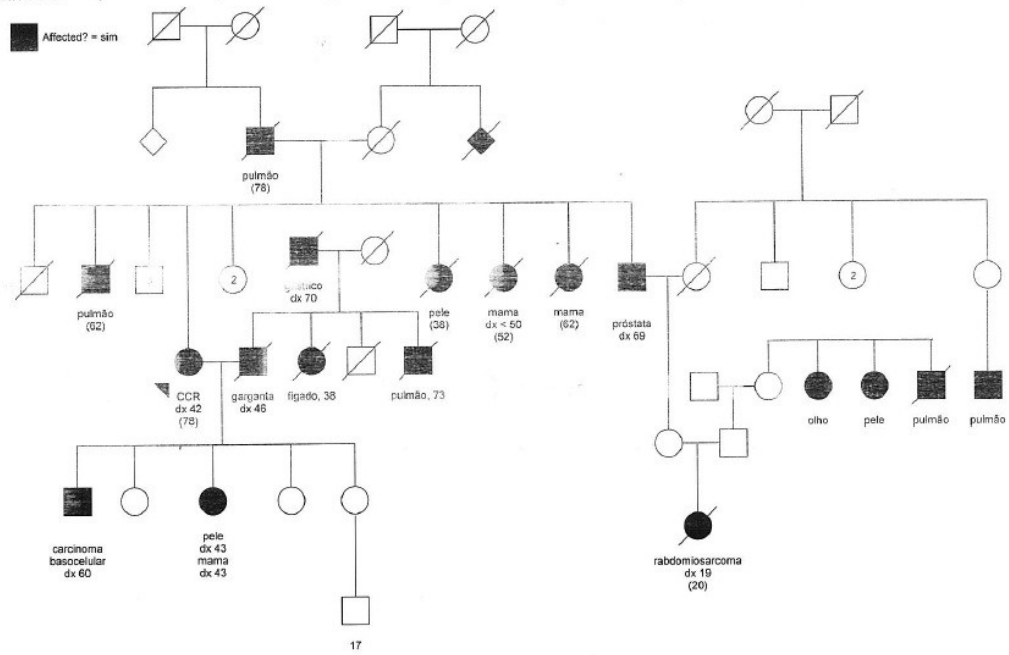


GGC 928
16/07/2009

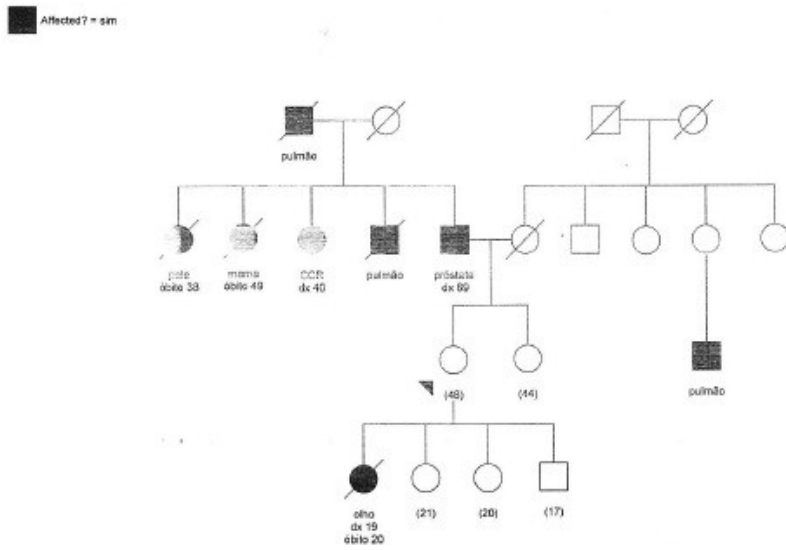
■ Affected? = sim



GGC 930
16/07/2009

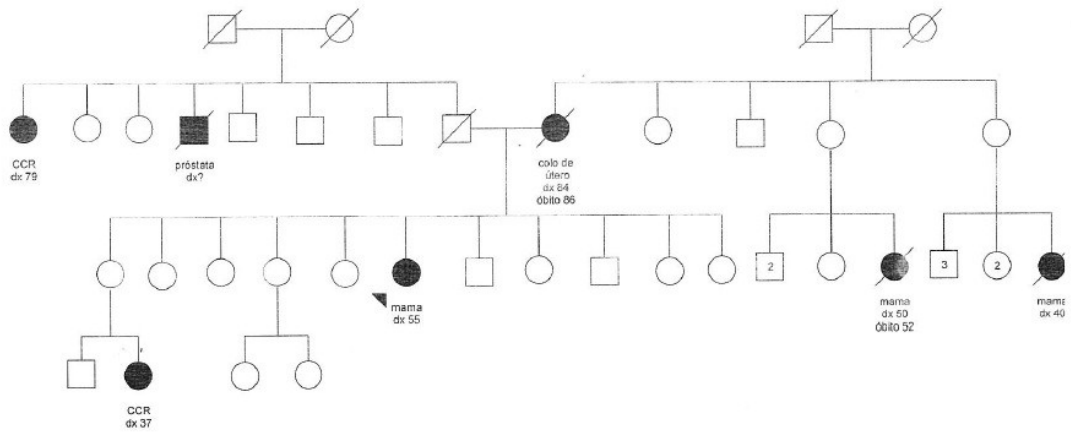


GGC 929
16/07/2009



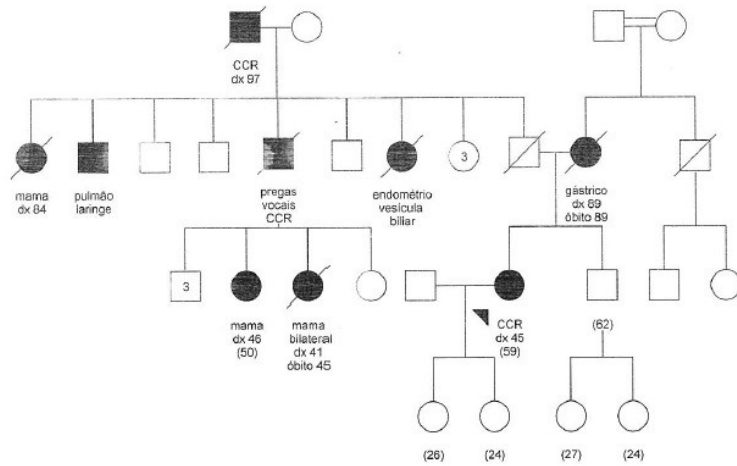
GGC 1136
15/07/2009

■ Affected? = sim



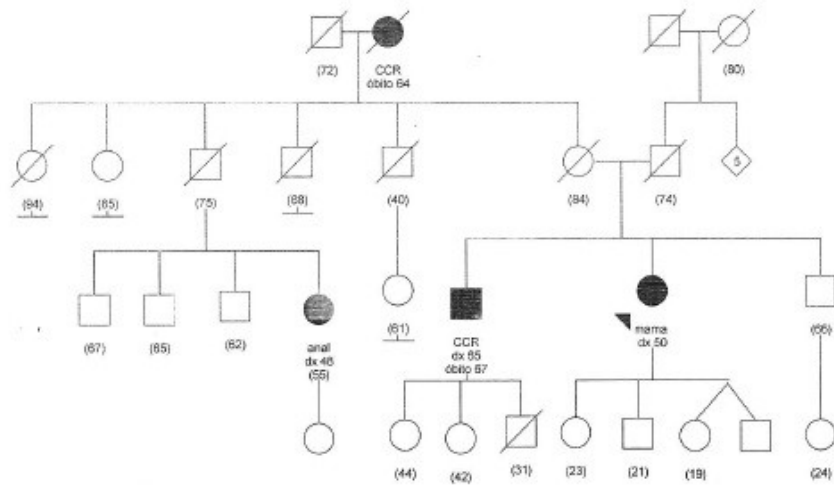
GGC 1080
15/07/2009

■ Affected? = sim



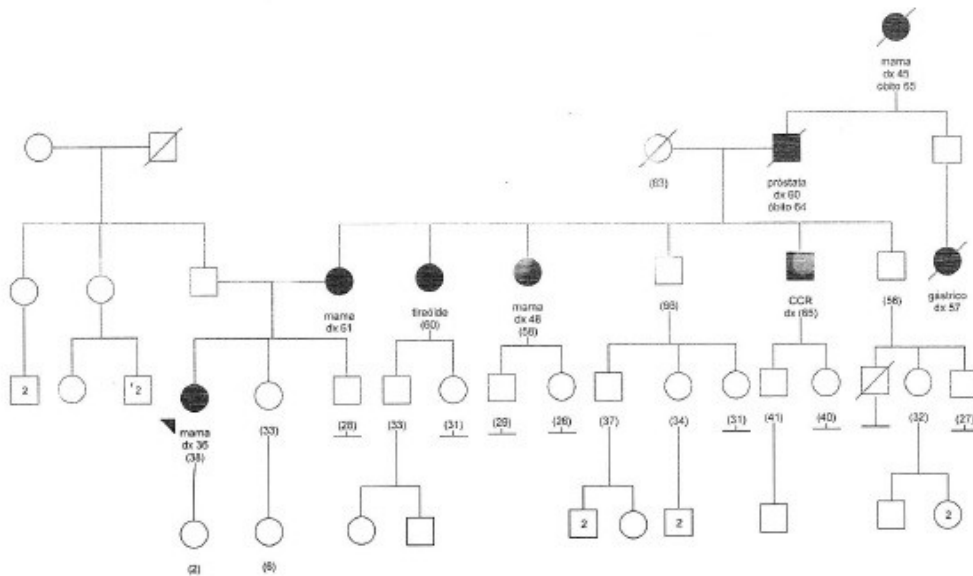
GGC 1149
15/07/2009

■ Affected? = sim



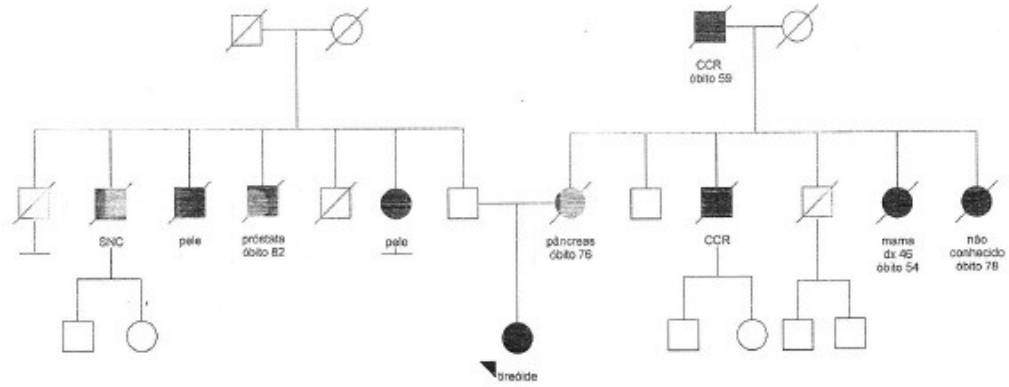
GGC 1148
15/07/2009

■ Affected? = sim



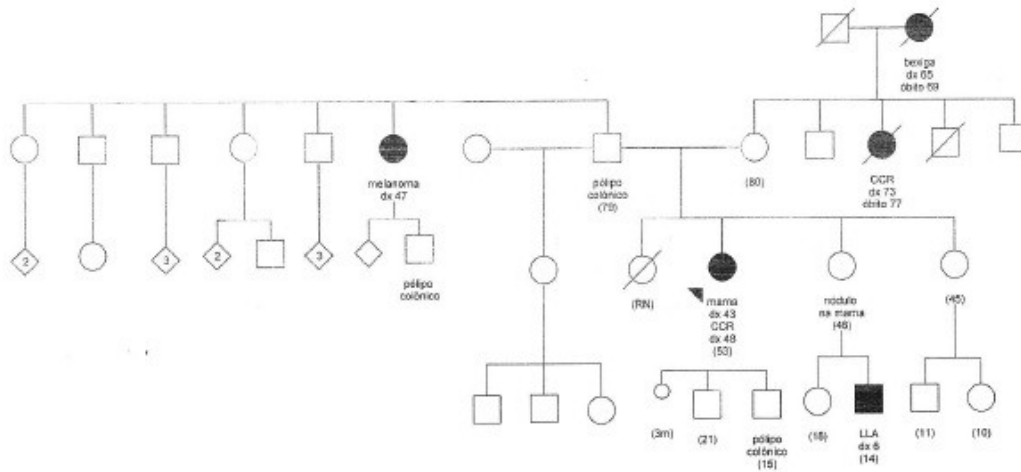
GGC 1151
15/07/2009

Affected? = sim



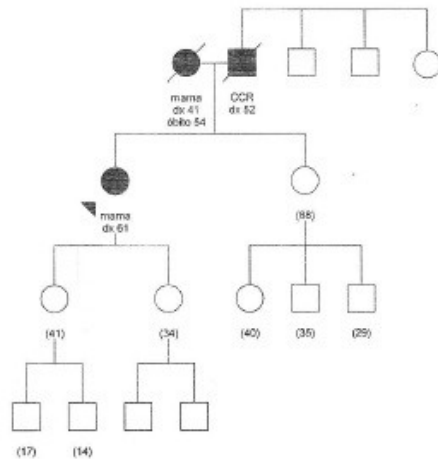
GGC 1150
15/07/2009

Affected? = sim



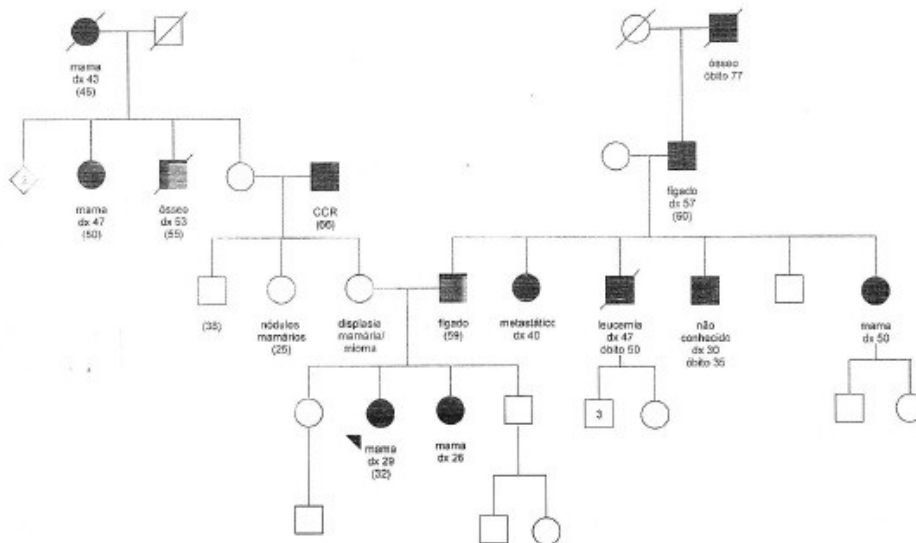
GGC 1153
15/07/2009

■ Affected? = sim



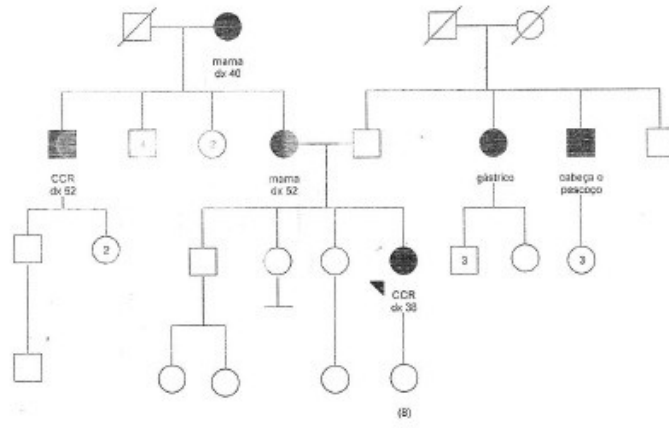
GGC 1152
15/07/2009

■ Affected? = sim



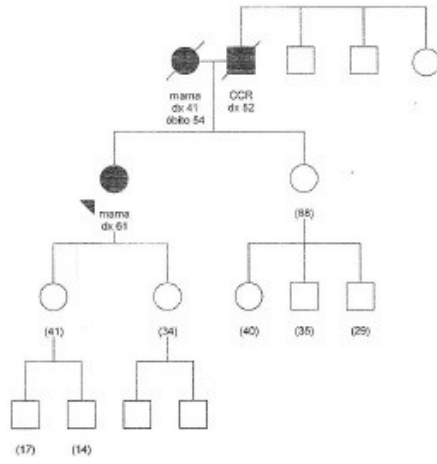
GGC 1155
15/07/2009

■ Affected? = sim



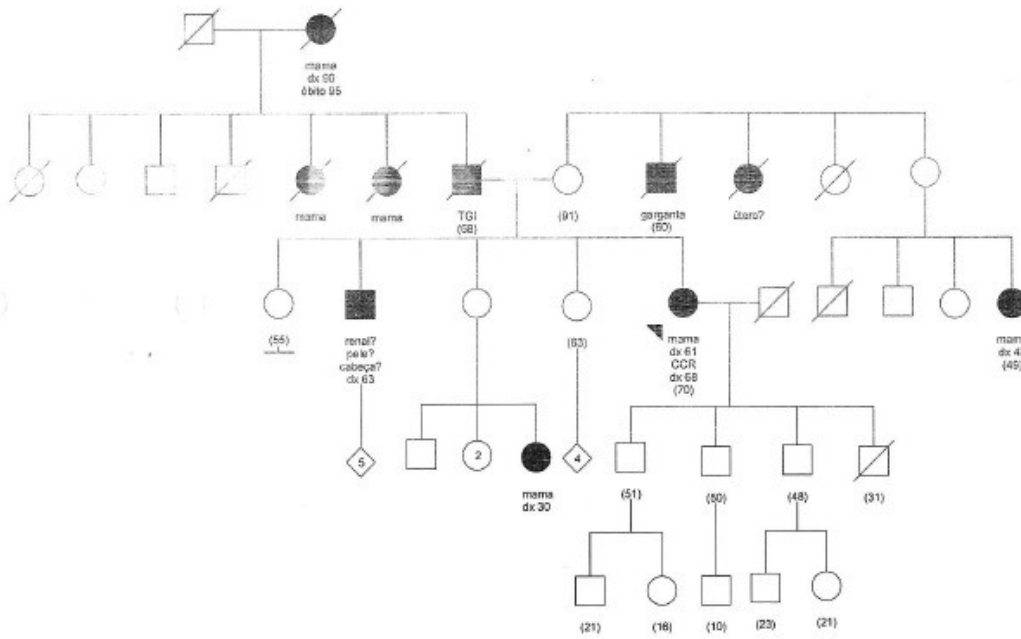
GGC 1153
15/07/2009

■ Affected? = sim



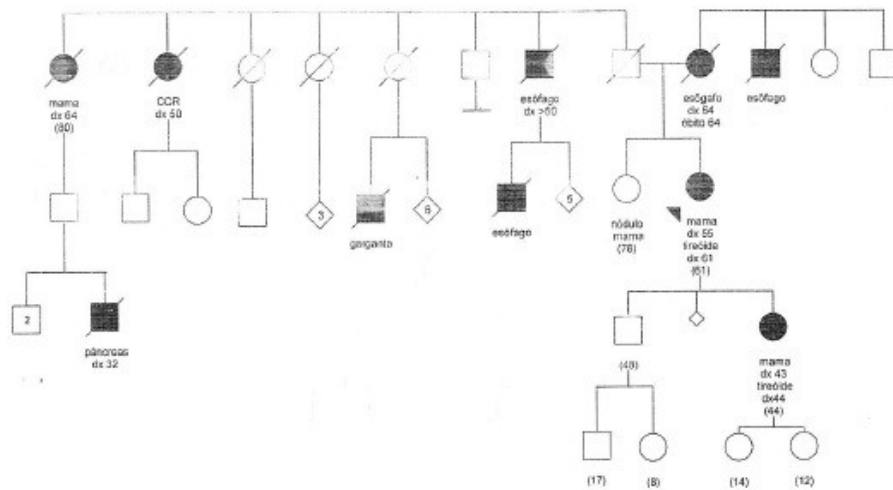
GGC 1157
15/07/2009

Affected? = sim



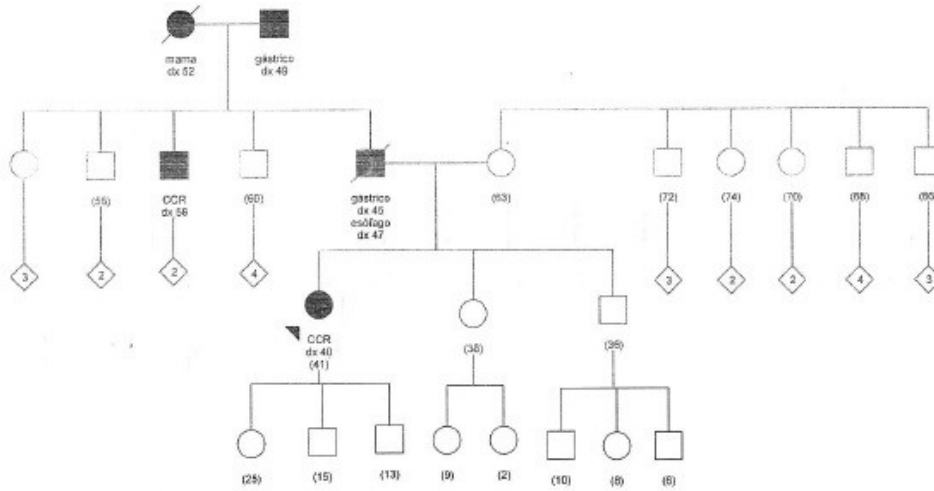
GGC 1156
15/07/2009

Affected? = sim



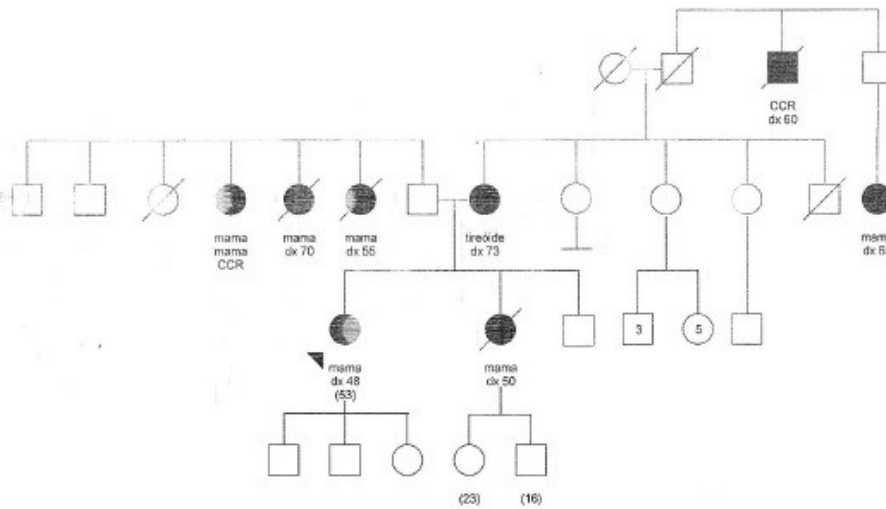
GGC 1158
15/07/2009

■ Affected? = sim



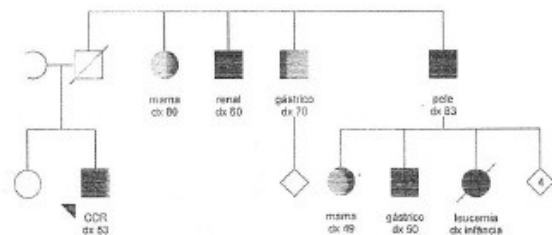
GGC 1164
15/07/2009

■ Affected? = sim



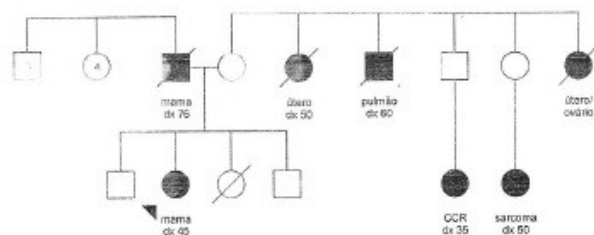
GGC 1168
15/07/2009

■ Affected? = sim



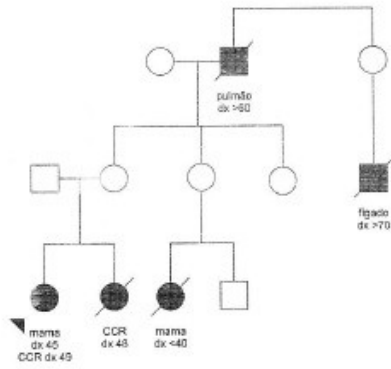
GGC 1167
15/07/2009

■ Affected? = sim



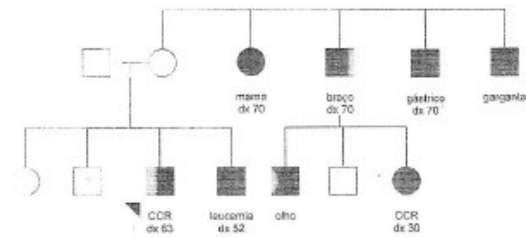
GGC 1171
15/07/2009

■ Afected? = sim



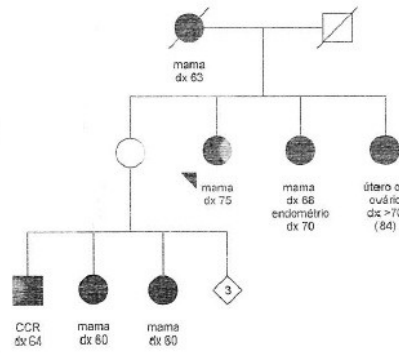
GGC 1169
15/07/2009

■ Afected? = sim



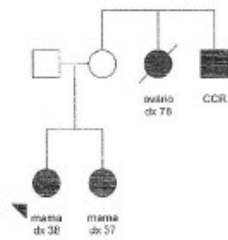
GGC 1173
15/07/2009

■ Affected? = sim



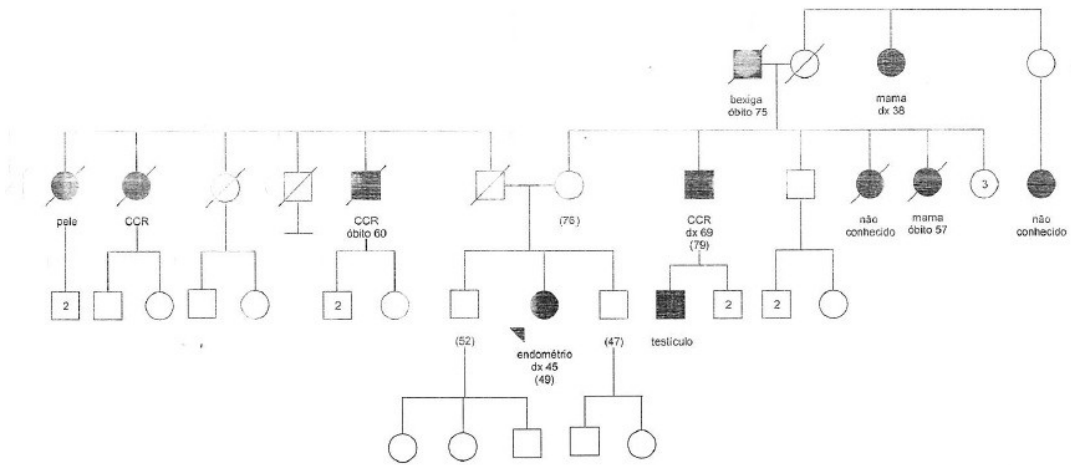
GGC 1172
15/07/2009

■ Affected? = sim



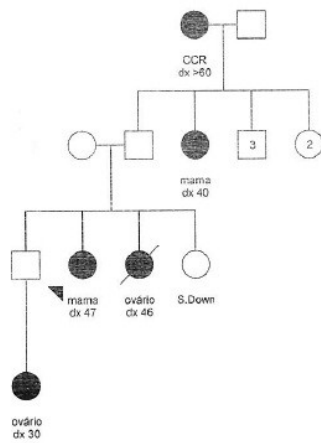
GGC 1181
15/07/2009

Affected? = sim



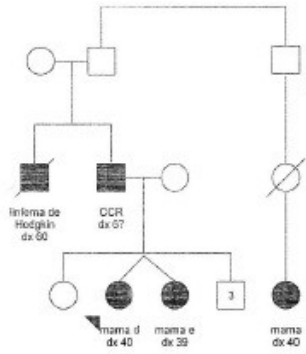
GGC 1175
15/07/2009

Affected? = sim



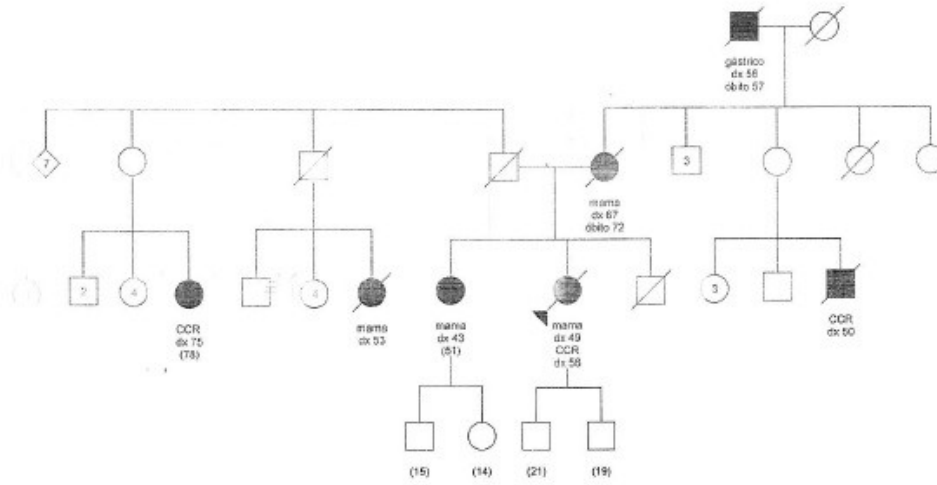
GGC 809
16/07/2009

■ Affected? - sim



GGC 1183
15/07/2009

■ Affected? = sim



GGC 1184
15/07/2009

■ Affected? = sim

