

**VARIAÇÃO NO NÚMERO DE CÓPIAS GENÔMICAS  
NA AVALIAÇÃO DE GENES PRINCIPAIS DE  
PREDISPOSIÇÃO EM PACIENTES COM SÍNDROME  
DE MAMA-CÓLON TRIADOS PARA MUTAÇÕES NOS  
GENES *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *CHEK2*, *MLH1* E *MSH2***

**FRANCINE BLUMENTAL DE ABREU**

**Tese apresentada à Fundação Antônio  
Prudente para obtenção do Título de Doutor  
em Ciências**

**Área de concentração: Oncologia**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Silvia Regina Rogatto**

**São Paulo**

**2012**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Abreu, Francine Blumental de

**Variação no número de cópias genômicas na avaliação de genes principais de predisposição em pacientes com síndrome de mama-cólon triados para mutações nos genes *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *CHEK2*, *MLH1* E *MSH2*** / Francine Blumental de Abreu – São Paulo, 2012.

245p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

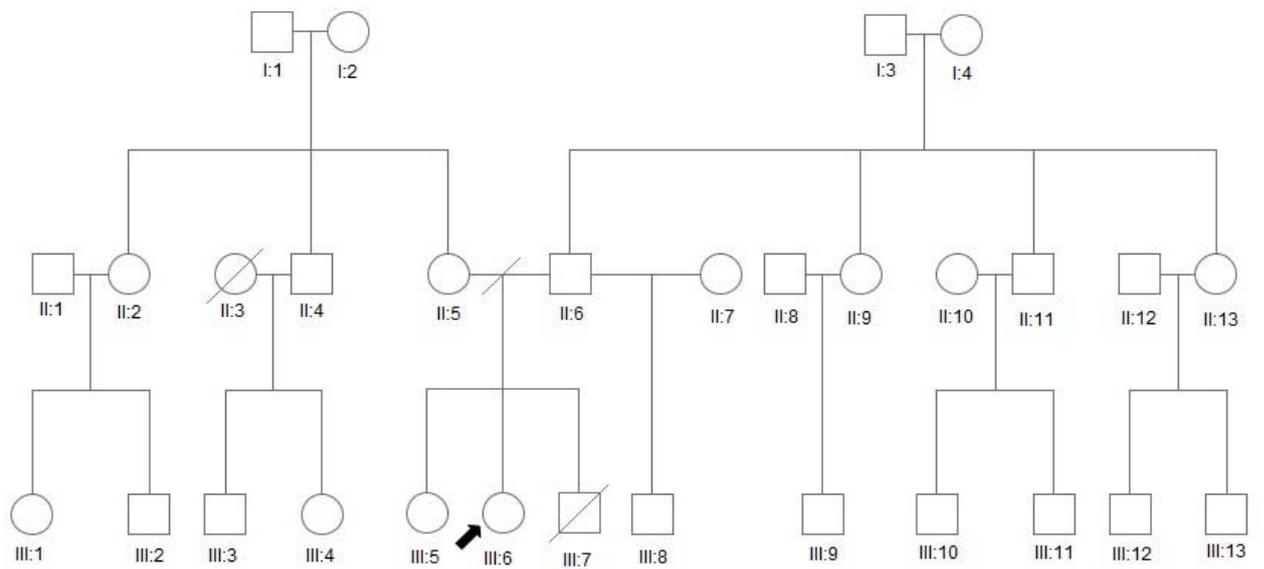
Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração:  
Oncologia.

Orientadora: Silvia Regina Rogatto

Descritores: 1. SÍNDROME DE LYNCH. 2. NEOPLASIAS DA MAMA.  
3. VARIAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIA DO DNA. 4. HIBRIDIZAÇÃO  
GENÔMICA COMPARATIVA.

# DEDICATÓRIA

A minha família!!!!



## AGRADECIMENTOS

### **À minha família...**

**Edilucia** (II:5) e **Antonio** (II:6) por serem mais do que pais, por serem mais do que amigos, por serem os meus super heróis! Obrigada pelos abraços, pelas palavras de apoio e de ensinamento, pelo carinho, pelo amor incondicional! Obrigada por estarem sempre disponíveis, por estenderem as mãos depois de uma “rasteira” da vida, por enxugarem as minhas lágrimas! Obrigada principalmente por me fazerem acreditar que momentos difíceis existem, mas ao lado de vocês, eles se tornam mais fáceis. Obrigada por existirem, obrigada simplesmente por tudo! Obrigada!! Amo vocês!!!

**Luciana** (II:7) pelas palavras de apoio e de ensinamento, pelo carinho e pelo amor!! Obrigada por também estender as mãos depois de uma “rasteira” da vida! Obrigada por fazer parte da minha vida! Obrigada!! Amo você!!!

**Patrícia** (III:5) pelo carinho e pelo amor!! Obrigada por me ouvir! Obrigada pelos conselhos e pelos “puxões de orelha”! Obrigada por cuidar da nossa mãe com tanto carinho e amor! Te amo minha irmã!!

**Marcelo** (III:7) (in memoriam), por estar presente (não de corpo, mas de alma) em todos os momentos da minha vida! Obrigada pelos sonhos!! Obrigada pelo perfume!! Te amo!!

**Leozinho** (III:8) pelos abraços apertados, pelos beijos “do gordo” e pelo brilho nos olhos quando me vê! Obrigada por demonstrar amor e carinho da forma mais sincera e pura! Te amo meu irmãozinho!!

**Lucy** (II:9) e **David** (II:8) pelo imenso carinho! Obrigada pelas palavras de amigo, ou melhor, pelas palavras de “mãe e pai”! Obrigada pela força e confiança! Amo vocês!!

**À minha orientadora...**

**Dra Silvia Regina Rogatto** pela oportunidade, atenção, preocupação, confiança e ensinamentos durante todos esses anos. Obrigada!!

Aos alunos e funcionários do **Laboratório Neogene**. Obrigada especial aos alunos Fernanda, Hellen e Mateus não só pelos ensinamentos e ajuda na realização desse trabalho, mas também pela amizade!

**Aos pesquisadores...**

**Dra Ana Krepischi** por ter me ajudado nos experimentos e análises de CGH array. Obrigada pelas palavras, abraços, carinho e disponibilidade nos momentos que mais precisei. Obrigada pela confiança!

**Dr Benedito** pela disponibilidade e atenção durante a execução deste trabalho. Obrigada pelo apoio e confiança!

**Dra Carla Rosemberg** pelo conselho e abraço no momento que mais precisei. Muito obrigada!

**Dra Dirce** por disponibilizar seu laboratório, seus alunos e funcionários no auxílio de alguns experimentos. Obrigada pela confiança!

**Dra Érika** pela disponibilidade, atenção e carinho. Obrigada por responder todos os meus e-mails com rapidez e eficiência!

**Dra Maria Isabel** por me ajudar na convocação de pacientes e pela disponibilidade. Obrigada, principalmente, pela confiança!

**Dr Rafael** pela disponibilidade e atenção durante os momentos finais da tese. Obrigada!

Agradecimento especial à Dra Ana Krepischi, Dra Dirce, Dr Fernando e Dra Maria Isabel por confiarem em mim e por me ajudarem na realização de um sonho! Obrigada do fundo meu coração!!

### **Aos meus amigos...**

“E o que importa não é o que você tem na vida, mas quem você tem na vida. E que bons amigos são a família que nos permitiram escolher”

(autor desconhecido)

**Elô e Carol** por serem mais do que amigas irmãs! Obrigada pelos queijos e vinhos, cervejas, piadas, conselhos, baladas, filmes...obrigada por me fazerem chorar de tanto rir...obrigada por enxugarem as minhas lágrimas...obrigada por existirem e fazerem parte da minha vida!!! Amo vocês!

**Eliane, Renata e Fabíola** por estarem perto mesmo estando longe! Obrigada pelos e-mails, telefonemas, mensagens, visitas! Obrigada pelos ensinamentos!! Obrigada pelo carinho!! Amo vocês!

**Tati e Amanda** pelo carinho, pelos conselhos e abraços! Obrigada por segurarem minhas mãos nos momentos mais difíceis! Obrigada pelos “puxões de orelha”! Obrigada por me fazerem sorrir!! Amo vocês!

### **Aos alunos e funcionários do laboratório LGBM...**

Bianca, Bruna, Cris, Dani, Elisa, Felipe, Gi e Márcia, pela disponibilidade em me ajudar na execução de alguns experimentos. Obrigada principalmente pelo carinho, pelos fortes abraços, pelos conselhos!!! Vocês são pessoas muito especiais!!

### **Ao hospital AC Camargo...**

**Funcionários do Banco de Macromoléculas** (Ana, Eloisa e Louise) pela ajuda na aquisição das amostras e ajuda na pesquisa de amostras. Obrigada especial a Ana e Eloisa por estarem do meu lado como amigas!

**Funcionários da Biblioteca** (Jefferson e Sueli) pelo auxílio durante as pesquisas bibliográficas, pesquisa de artigos científicos e revisão deste trabalho. Obrigada pelo carinho com que me trataram todos esses anos!

**Funcionárias da Pós-graduação** (Ana, Luciana e Vanusa) pelo auxílio oferecido no decorrer desses anos.

**Funcionários do SAME** por separar os prontuários dos pacientes dessa pesquisa.

### **As Instituições de Fomento...**

**FAPESP e CNPq** pelo suporte financeiro.

O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.

(Fernando Pessoa)

## RESUMO

Abreu FB. **Variação no número de cópias genômicas na avaliação de genes principais de predisposição em pacientes com Síndrome de Mama-Cólon triados para mutações nos genes *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *CHEK2*, *MLH1* e *MSH2***. São Paulo; 2012. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

A Síndrome de Lynch (SL) é uma síndrome hereditária de predisposição ao câncer colorretal associado com um risco aumentado de desenvolvimento de tumores extracolônicos. No Brasil, o carcinoma mamário é o tumor extracolônico de maior incidência na SL. Neste estudo, 65 pacientes foram divididos em três grupos: 1 e 2, composto por 59 pacientes negativos para mutações nos genes *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *CHEK2*, *MLH1* e *MSH2* e, 3, formado por 6 pacientes com mutação em um desses genes. O grupo 1 apresentava 26 pacientes com câncer de mama ou colorretal, grupo 2 apresentava 33 pacientes com câncer de mama e colorretal. As variações no número de cópias genômicas (CNVs) foram investigadas pelo método de CGH array utilizando a plataforma de 4x180K (Agilent Technologies). Os dados foram extraídos no Software Feature Extraction e analisados no Software Genomic Workbench 5.0. Para a análise foram utilizados o algoritmo estatístico ADM-2, threshold 6,7 e  $-0,3 \leq \log_2 \geq 0,3$  para determinar as regiões de ganhos e perdas genômicas. As alterações foram comparadas com o banco de dados DGV e com um banco de dados específico da população brasileira (grupo referência). Na análise de aCGH, foram identificadas 451 alterações, sendo 161 do grupo 1, 257 do grupo 2 e 33 do grupo 3. Após a comparação com o banco de dados da população brasileira, as alterações foram classificadas em comuns, raras e novas raras. Foram consideradas como relevantes para o estudo apenas as CNVs raras, identificadas em 1% da população de referência, e as CNVs novas raras, ausentes tanto na população de referência como no banco de dados DGV.

Entre os pacientes sem mutação, foram identificadas CNVs novas raras comuns e exclusivas aos grupo 1 e 2. O gene *SLC38A6* foi identificado em duas pacientes do grupo 1 e uma do grupo 2. É um gene envolvido no transporte de glutamina, um aminoácido envolvido em muitas funções, entre elas produção de ATP. Os genes envolvidos em ganho genômico, *GRM1* e *TMPRSS3* (exclusivos do grupo 1) e *FOXP1* e *BLM* (exclusivos do grupo 2) têm potencial para contribuir para o desenvolvimento tumoral. Na análise familiar, foram identificados genes e microRNA envolvidos em CNVs raras e novas raras com potencial para o desenvolvimento e predisposição ao câncer de mama e colorretal. A perda genômica no gene *ROBO1* foi identificada em duas pacientes (grupo 1 e 2) e em seus respectivos familiares. Essa alteração foi confirmada por qPCR e a baixa expressão da proteína ROBO1 foi associada com pior prognóstico da doença. Os resultados sugerem que determinadas alterações genômicas tem potencial associação com a predisposição hereditária tumores de mama e colorretal.

## SUMMARY

Abreu FB. **[Analysis of copy number alterations in patients with breast and colorectal cancer syndrome that are negative for *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *CHEK2*, *MLH1* and *MSH2* mutations]**. São Paulo, 2012. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Lynch syndrome (LS) is a hereditary colorectal cancer syndrome associated to an increased risk to develop extracolonic tumors. In Brazil, breast cancer is the extracolonic tumor with more incidence among LS patients. On this study, 65 patients were divided into three groups: 1 and 2, composed of 59 patients negative for *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *CHEK2*, *MLH1* and *MSH2* mutations and, 3, composed of six patients with a mutation in one of these genes. Group 1 had 26 patients with breast or colorectal cancer and group 2 had 33 patients with breast and colorectal cancer. Copy number variations (CNVs) were investigated by CGH array using 4x180K platform (Agilent Technologies). Data were extracted by Feature Extraction Software and analyzed by Genomic Workbench 5.0 Software, using the ADM2 algorithm with a 6.7 threshold and absolute log ratio filter of  $-0,3 \leq \log_2 \leq 0,3$  to identify genomic losses and gains. The DNA copy number imbalances were compared to a Database of Genomics Variants (DGV) and to a Brazilian reference group. It was identified 451 CNVs, where 161, 257 and 33 were from group 1, 2 and 3, respectively. After the comparison with the reference group, the CNVs were divided into common, rare and new rare. It was considered for further analysis rare CNVs (identified in less than 1% of the reference group) and new rares (absent in the reference group and DGV). In cases with absence of gene mutations, new rare CNVs were both commonly and exclusively detected in groups 1 and 2. Gain at *SLC38A6* gene was identified in two patients from group 1 and one patient from group 2. This gene is involved on glutamine transport, that is an amino acid with multiple functions, including ATP production. The *GRM1* and *TMPRSS3* genes

(exclusive from group 1) and *FOXP1* and *BLM* genes (exclusive from group 2), all involved in genomic gains, may contribute to tumor development. The familial member analysis, specific rare and new rare CNVs mapped on specific genes as well as microRNAs were candidates to be associated breast and colorectal cancer predisposition. Loss at *ROBO1* gene was observed in two patients (group 1 and 2) and in their affected relatives. This alteration was confirmed by qPCR. In addition, weak *ROBO1* protein immunexpression was associated with worse prognosis in hereditary breast and colorectal tumors. In overall, these results suggest the involvement of specific genomic alterations in hereditary breast and colorectal cancer predisposition.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Fluxograma representando os três subgrupos referente ao grupo amostral.....	20
<b>Figura 2</b>	Representação gráfica dos iniciadores utilizados na qPCR para confirmação da perda de sequências do gene <i>ROBO1</i> ...	44
<b>Figura 3</b>	Representação gráfica dos iniciadores utilizados na qPCR para mapeamento da deleção do gene <i>ROBO1</i> .....	45
<b>Figura 4</b>	Representação gráfica das mutações identificadas no gene <i>MLH1</i> .....	55
<b>Figura 5</b>	Representação gráfica das mutações identificadas no gene <i>MSH2</i> .....	56
<b>Figura 6</b>	Frequência de CNVs no grupo controle e amostral.....	58
<b>Figura 7</b>	Representação gráfica das alterações genômicas identificadas no grupo 1 e 2.....	62
<b>Figura 8</b>	Representação gráfica dos tipos de CNVs (comuns, raras, novas raras) detectadas após a comparação com o grupo controle nos dois grupos de casos.....	63
<b>Figura 9</b>	Representação gráfica do número de CNVs raras e novas raras envolvidas em ganhos e perdas genômicas.....	77
<b>Figura 10</b>	Representação esquemática do ganho envolvendo o gene <i>SLC38A6</i> mapeado em 14q23.1 e os heredogramas das pacientes com essa alteração.....	101

<b>Figura 11</b>	Representação esquemática do ganho envolvendo o gene KIAA1211 e FOXN3 e o heredograma da paciente SM98.....	105
<b>Figura 12</b>	Representação esquemática do ganho envolvendo o gene MAD1L1 e o heredograma da paciente VCS.....	107
<b>Figura 13</b>	Representação esquemática das alterações identificadas na paciente SM87.....	113
<b>Figura 14</b>	Representação esquemática da perda envolvendo o gene PTPRN2 e o heredograma da paciente SM6.....	115
<b>Figura 15</b>	Representação esquemática do ganho envolvendo o gene RCBTB1, mapeado em 13q14.3.....	116
<b>Figura 16</b>	Representação gráfica do total de alterações genômicas identificadas nos pacientes positivos para mutações nos genes BRCA1/BRCA2 e MLH1.....	118
<b>Figura 17</b>	Heredograma do caso SM56.....	140
<b>Figura 18</b>	Heredograma do caso SM37.....	141
<b>Figura 19</b>	Representação esquemática das sondas mapeadas na região envolvida em perda genômica e na região exônica mais próxima à alteração.....	143
<b>Figura 20</b>	Representação esquemática da deleção do gene ROBO1 em 3p12.3.....	145
<b>Figura 21</b>	Representação gráfica das mutações identificadas no gene ROBO1.....	148
<b>Figura 22</b>	Análise gráfica dos resultados obtidos na qPCR.....	150

<b>Figura 23</b>	Análise gráfica dos resultados obtidos por CGH array e qPCR.....	152
<b>Figura 24</b>	Análise gráfica dos resultados obtidos na qPCR.....	155
<b>Figura 25</b>	Representação gráfica do sítio de splicing alternativo envolvendo o éxon 4 do gene ROBO1, a partir da análise de bioinformática realizada no site UCSC.....	156
<b>Figura 26</b>	Marcação citoplasmática forte da proteína ROBO1 em tecido normal de mama.....	157
<b>Figura 27</b>	Padrão de expressão citoplasmática da proteína ROBO1 em células de carcinomas mamários.....	159
<b>Figura 28</b>	Padrão de expressão citoplasmática da proteína ROBO1 em células de carcinoma colorretal.....	163
<b>Figura 29</b>	Heredograma do caso SM89.....	167
<b>Figura 30</b>	Análise citogenética do caso SM89.....	169
<b>Figura 31</b>	Análise citogenética do caso SM89.2.....	170
<b>Figura 32</b>	Análise citogenética do caso SM89.4.....	171
<b>Figura 33</b>	Análise citogenética do caso SM89.5.....	172
<b>Figura 34</b>	Análise citogenética dos casos SM89.6 e SM89.7.....	173
<b>Figura 35</b>	Representação gráfica do sequenciamento do gene BRCA1 na paciente SM89 e seus familiares.....	175

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Classificação dos pacientes de acordo com os critérios estabelecidos para a Síndrome Hereditária do Câncer de Mama-Cólon.....	24
<b>Tabela 2</b>	Dados clínicos e histopatológicos das pacientes do grupo 1...	26
<b>Tabela 3</b>	Dados clínicos e histopatológicos das pacientes do grupo 2...	28
<b>Tabela 4</b>	Idade do desenvolvimento do primeiro tumor nas pacientes do grupo 1, 2 e 3.....	29
<b>Tabela 5</b>	Iniciadores utilizados no sequenciamento do gene <i>ROBO1</i> ....	32
<b>Tabela 6</b>	Condições da PCR para os genes <i>MLH1</i> , <i>MSH2</i> e <i>ROBO1</i> ....	34
<b>Tabela 7</b>	Categorização dos genes envolvidos em CNVs novas raras por CGH <i>array</i> quanto às classes funcionais.....	41
<b>Tabela 8</b>	Iniciadores utilizados nas amplificações pela PCR.....	43
<b>Tabela 9</b>	Mutações patogênicas nos genes <i>BRCA1</i> e <i>BRCA2</i> identificadas em quatro pacientes.....	53
<b>Tabela 10</b>	Mutações não patogênicas previamente descritas no LOVD e <i>MMR Gene Unclassified Variants Database</i> , identificadas em nove pacientes.....	54
<b>Tabela 11</b>	Alterações novas raras e raras detectadas no grupo 1 após comparação com o grupo de referência.....	65

<b>Tabela 12</b>	Alterações novas raras e raras detectadas no grupo 2 após comparação com o grupo de referência.....	69
<b>Tabela 13</b>	Alterações raras comuns aos grupos 1 e 2 ou exclusivas de cada grupo, após comparação com o grupo de referência.....	79
<b>Tabela 14</b>	Alterações novas raras comuns aos grupos 1 e 2 ou exclusivas de cada grupo.....	91
<b>Tabela 15</b>	Alterações com genes descritos utilizando o Hg19 (NCBI Build 37, February 2009).....	94
<b>Tabela 16</b>	Funções dos genes mapeados nas CNVs novas raras, geradas pelo software <i>DNA Analytics</i> .....	96
<b>Tabela 17</b>	Base de dados das sequências genômicas de acordo com as CNVs novas raras detectadas.....	97
<b>Tabela 18</b>	Total de CNVs identificadas nos pacientes com mutação.....	117
<b>Tabela 19</b>	Alterações identificadas nos pacientes com mutação nos genes <i>BRCA1</i> , <i>BRCA2</i> e <i>MLH1</i> .....	120
<b>Tabela 20</b>	Alterações identificadas na paciente SM6 e seus familiares....	127
<b>Tabela 21</b>	Alterações identificadas na paciente SM26 e seus familiares..	128
<b>Tabela 22</b>	Alterações identificadas na paciente SM34 e seus familiares..	130
<b>Tabela 23</b>	Alterações identificadas na paciente SM37 e seus familiares.	132
<b>Tabela 24</b>	Alterações identificadas na paciente SM56 e seus familiares..	135

<b>Tabela 25</b>	Alterações identificadas na paciente SM83 e seus familiares..	136
<b>Tabela 26</b>	Alterações identificadas na paciente SM87 e seus familiares..	137
<b>Tabela 27</b>	Mutações silenciosas identificadas nos familiares da paciente SM37.....	147
<b>Tabela 28</b>	Comparação entre os dados clínicos e moleculares e os familiares da paciente SM37, que apresentaram mais de uma mutação silenciosa e não patogênica no <i>ROBO1</i> .....	147
<b>Tabela 29</b>	Cálculo do intervalo da dosagem gênica, a partir da relação entre os genes <i>HPRT</i> e <i>GAPDH</i> .....	150
<b>Tabela 30</b>	Comparação entre a intensidade de sinal obtida nas metodologias de CGH <i>array</i> e qPCR.....	151
<b>Tabela 31</b>	Resultados da eficiência dos genes endógenos e alvo na qPCR.....	153
<b>Tabela 32</b>	Intensidade de sinal obtida na metodologia de qPCR em todos os casos e em cada par de iniciador.....	154
<b>Tabela 33</b>	Associação entre a expressão da proteína ROBO1, detectada por imunistoquímica, e os dados clínicos de amostras tumorais de mama com história de câncer.....	160
<b>Tabela 34</b>	Associação entre a expressão da proteína ROBO1, detectada por imunistoquímica, e os dados clínicos de amostras tumorais de colorretal que preencheram aos critérios de Bethesda com história familiar positiva de câncer.	164

<b>Tabela 35</b>	Características fenotípicas observadas na paciente SM89 e em dois familiares.....	168
<b>Tabela 36</b>	Resumo das características da família SM89.....	175
<b>Tabela 37</b>	Alterações identificadas na paciente SM89 e em seus familiares, geradas pelo software <i>DNA Analytics</i> .....	178

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>aCGH*</b>	<i>Array comparative genomic hybridization</i>
<b>ADM-2*</b>	<i>Aberration detection method 2</i>
<b>ATP*</b>	<i>Adenosine triphosphate</i>
<b>CCR</b>	Câncer colorretal
<b>CDCV*</b>	<i>Common disease, common variant</i>
<b>CDRV*</b>	<i>Common disease, rare variant</i>
<b>CGH*</b>	<i>Comparative genomic hybridization</i>
<b>CM</b>	Câncer de mama
<b>CNA*</b>	<i>Copy number alteration</i>
<b>CNV*</b>	<i>Copy number variation</i>
<b>Cq</b>	Ciclo de quantificação
<b>Cy3*</b>	<i>Cyanine 3</i>
<b>Cy5*</b>	<i>Cyanine 5</i>
<b>DAPI*</b>	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
<b>ddNTP*</b>	<i>Dideoxynucleotide</i>
<b>DGV*</b>	<i>Database of genomic variants</i>
<b>DNA*</b>	<i>Deoxiribonucleic acid</i>
<b>dUTP*</b>	<i>Deoxyuridine triphosphate</i>
<b>EASE*</b>	<i>The expression analysis systematic explorer</i>
<b>ER*</b>	<i>Estrogen receptor</i>
<b>Exo-Sap I*</b>	<i>Exonuclease I and Shrimp alkaline phosphatase</i>
<b>FAP</b>	Polipose adenomatose familiar
<b>gDNA</b>	DNA genômico
<b>GVGD*</b>	<i>International agency for research on cancer</i>
<b>HBCC*</b>	<i>Hereditary breast and colorectal cancer</i>
<b>HER-2*</b>	<i>Human epidermal growth factor receptor 2</i>
<b>HNPCC*</b>	<i>Hereditary non-polyposis colorectal carcinoma</i>
<b>IHQ</b>	Imunoistoquímica
<b>INCA</b>	Instituto Nacional do Câncer

<b>InSiGHT*</b>	<i>International society for gastrointestinal hereditary tumours</i>
<b>ISCN*</b>	<i>International software consulting network</i>
<b>LCR*</b>	<i>Low copy repeats</i>
<b>LOH*</b>	<i>Loss of heterozygosity</i>
<b>LOVD*</b>	<i>Leiden open variation database</i>
<b>mirDIP*</b>	<i>MicroRNA data integration portal</i>
<b>MLPA*</b>	<i>Multiplex ligation-dependent probe amplification</i>
<b>MMR*</b>	<i>Mismatch repair</i>
<b>MSI*</b>	<i>Microsatellite instability</i>
<b>MSI-H*</b>	<i>High microsatellite</i>
<b>MSI-L*</b>	<i>Low microsatellite</i>
<b>MS-PCR*</b>	<i>Methylation specific polymerase chain reaction</i>
<b>MSS*</b>	<i>Microsatellite stable</i>
<b>NCBI*</b>	<i>National center for biotechnology information</i>
<b>PCR*</b>	<i>Polymerase chain reaction</i>
<b>Polyphen*</b>	<i>Polymorphism phenotyping</i>
<b>qPCR*</b>	<i>Quantitative polymerase chain reaction</i>
<b>qRT-PCR*</b>	<i>Quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction</i>
<b>SHCMC</b>	Síndrome hereditária do câncer de mama-cólon
<b>SIFT*</b>	<i>Sorting intolerant from tolerant</i>
<b>SIFT*</b>	<i>Sorting intolerant from tolerant</i>
<b>SL</b>	Síndrome de Lynch
<b>SL1</b>	Síndrome de Lynch 1
<b>SL2</b>	Síndrome de Lynch 2
<b>SMC</b>	Síndrome mama-cólon
<b>SMCMH</b>	Síndrome mama-cólon Meijers-Heijboer
<b>SMCN</b>	Síndrome mama-cólon Naseem
<b>SMO</b>	Síndrome de mama-ovário
<b>SNP*</b>	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
<b>TMA*</b>	<i>Tissue microarray</i>
<b>TNM</b>	Estadio clínico
<b>UCSC*</b>	<i>University of California, Santa Cruz</i>

**UTR\***      *Untranslated region*

**VNTR\***      *Variable number of tandem repeats*

\*siglas ou abreviaturas derivadas do inglês

Obs: a lista de genes foram geradas pelo software *DNA Analytics* (Agilent Technologies)

# ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1	Câncer Colorretal - Síndrome de Lynch (SL).....	3
1.2	Síndrome de Câncer de Mama-Cólon Hereditário (HBC) .....	10
1.3	Variação no Número de Cópias Genômicas (CNVs).....	13
<b>2</b>	<b>OBJETIVO</b> .....	<b>18</b>
2.1	Objetivo Principal.....	18
2.2	Objetivos Secundários.....	18
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>19</b>
3.1	Caracterização das amostras .....	19
3.2	Metodologia .....	30
3.2.1	Obtenção de DNA genômico .....	30
3.2.2	Sequenciamento dos genes <i>MLH1</i> , <i>MSH2</i> e <i>ROBO1</i> .....	31
3.2.3	Hibridação genômica comparativa baseada em <i>arrays</i> (aCGH ou CGH <i>array</i> ) .....	36
3.2.4	PCR quantitativa em Tempo Real (qPCR) .....	41
3.2.5	Imunoistoquímica (IHQ).....	47
3.2.6	Análise citogenética clássica .....	50
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>52</b>
4.1	Sequenciamento.....	52
4.1.1	Genes <i>BRCA1</i> , <i>BRCA2</i> , <i>TP53</i> e <i>CHEK2</i> .....	52
4.1.2	Genes <i>MLH1</i> e <i>MSH2</i> .....	53
4.2	Hibridação genômica comparativa baseada em <i>arrays</i> (aCGH ou CGH <i>array</i> ) .....	57
4.2.1	Casos sem mutação nos genes <i>BRCA1</i> , <i>BRCA2</i> , <i>TP53</i> , <i>CHEK2</i> , <i>MLH1</i> e <i>MSH2</i> .....	57
4.2.2	Casos com mutação .....	117

4.2.3	Análise de CNVs entre os familiares .....	123
4.3	Análise em famílias específicas.....	139
4.3.1	Família SM56 (Grupo 1) e SM37 (Grupo 2).....	139
4.3.2	Família SM89 .....	166
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>182</b>
5.1	CGH array .....	185
5.1.1	Casos sem mutação nos genes <i>BRCA1</i> , <i>BRCA2</i> , <i>TP53</i> , <i>CHECK2</i> , <i>MLH1</i> e <i>MSH2</i> .....	185
5.1.2	Casos com mutação.....	201
5.1.3	Análise de CNVs entre os familiares .....	204
5.2	Análise em famílias específicas.....	210
5.2.1	Família SM56 (Grupo 1) e SM37 (Grupo 2).....	210
5.2.2	Família SM89 .....	219
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>223</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS .....</b>	<b>225</b>

## **ANEXOS**

- Anexo 1** Heredogramas
- Anexo 2** Critério de Amsterdam
- Anexo 3** Critério de Bethesda

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama (CM) é a segunda neoplasia maligna mais frequente e a primeira entre as mulheres, sendo responsável por 23% (1,38 milhões) de todos os novos casos de câncer e 14% (458.400) do total de mortes pela doença no mundo (JEMAL et al. 2011). Aproximadamente 50% desses casos e 60% das mortes pela doença ocorrem em países em desenvolvimento, devido à falta de disponibilidade aos serviços de detecção precoce da doença. Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), estão previstos 52.680 novos casos de CM para 2012. Na região Sudeste, essa neoplasia é a mais incidente entre as mulheres com um risco estimado de 29.360 casos novos por 100 mil (Ministério da Saúde 2011).

Os fatores ambientais e genéticos são considerados como mais importantes associados ao risco de desenvolvimento do carcinoma de mama. Os fatores ambientais são determinados pelo estilo de vida adotado pelo paciente, como preferência por uma dieta alimentar pouco saudável, baseada em gorduras e proteínas de origem animal, baixa ingestão de frutas, vegetais e cereais, exposição cumulativa a estrógenos e ou progesterona (FUQUA 2001), menarca precoce e menopausa tardia (WILLET et al. 1999), entre outros. Os fatores genéticos incluem a história familiar positiva para a presença da doença, presença de genes de predisposição e ou suscetibilidade associados à iniciação e progressão tumoral (PETERS et al. 2001; THOMPSON e EASTON 2004).

O câncer colorretal (CCR) é o terceiro tumor mais frequente em mulheres, com uma estimativa de 15.960 novos casos para o ano de 2012 no Brasil (Ministério da Saúde 2011). Na região Sudeste, essa é a segunda neoplasia mais frequente em mulheres, representando 9.800 casos novos por 100 mil (Ministério da Saúde 2011). Segundo JEMAL et al. (2011), a incidência dos CCRs está diminuindo somente nos EUA, devido à detecção e remoção de lesões pré-malignas resultante de uma política de incentivo aos testes de *screening* para a detecção precoce da doença. ATKIN et al. (2010) relataram que se pacientes entre 55 e 64 anos de idade fizessem testes de *screening*, a incidência do CCR diminuiria em 33% e a mortalidade em 43%.

Os fatores de risco do CCR também estão associados com fatores ambientais, determinados pelo estilo de vida do paciente, como consumo excessivo de álcool e tabaco (FRANCO et al. 2005), preferência por uma dieta alimentar pouco saudável, e por fatores genéticos. Estes correspondem à história familiar positiva para a presença da doença e a presença de mutação em genes de predisposição ao desenvolvimento tumoral, como o *APC* (responsável pela Polipose Adenomatose Familiar - FAP) e os genes de reparo a danos no DNA (do inglês, *mismatch repair genes* - MMR) (responsáveis pela Síndrome de Lynch) (LYNCH et al. 2006).

As síndromes hereditárias de câncer representam entre 5-10% dos casos e os agrupamentos familiares correspondem a 10-15% (NAGY et al. 2004). Enquanto os casos de agrupamentos de câncer podem ser causados pela interação entre genes de baixa ou moderada penetrância, interações

gene-ambiente, ou ambos, as síndromes hereditárias são resultantes de mutações germinativas em genes de alta penetrância (NAGY et al. 2004). Baseado na magnitude do risco, as famílias podem ser classificadas em alto risco, constituindo as síndromes de câncer hereditário, e risco moderado, que constituem agregados familiares sem um padrão Mendeliano clássico (NAGY et al. 2004; HAMPEL et al. 2004).

Embora as mutações germinativas em genes de alta penetrância sejam responsáveis por uma pequena parcela (5-10%) dos casos de câncer em mulheres, mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* são responsáveis por 50-70% dos casos de câncer de mama familiar (HIRSHFIELD et al. 2010). Mutações germinativas nesses genes estão associadas à Síndrome de Câncer de Mama e Ovário (FEARON 1997). Porém, mutações herdadas relacionadas a outros genes e ou associadas a algumas síndromes também influenciam no risco aumentado de desenvolver o câncer de mama. A Síndrome de Li-Fraumeni resulta em uma mutação no gene *TP53* e está associada a um risco aumentado de desenvolver o tumor em idade jovem. Uma deleção no gene *CHEK2* está associada a um risco duas vezes maior de desenvolvimento do câncer de mama (MEIJERS-HEIJBOER et al. 2002).

## **1.1 CÂNCER COLORRETAL - SÍNDROME DE LYNCH (SL)**

Aproximadamente entre 20 a 30% dos casos de câncer colorretal apresentam um componente familiar na sua origem que, na maioria das

vezes, está associado com a história familiar positiva da doença (KOH et al. 2011).

O câncer Colorretal Hereditário sem Polipose (do inglês, *Hereditary Non-Polyposis Colorectal Carcinoma* - HNPCC) ou Síndrome de Lynch (SL) é uma doença autossômica dominante de alta penetrância, responsável por 2 a 5% dos casos de CCR do mundo (LYNCH et al. 2009; BIANCHI et al. 2011; LASTELLA et al. 2011). A SL pode ser classificada em SL1 e SL2 de acordo com a presença ou ausência de tumores extracolônicos. A Síndrome de Lynch 1 está associada à predisposição herdada de forma autossômica dominante do carcinoma colorretal sem polipose em idade precoce, predileção pelo cólon proximal e múltiplos CCRs primários. A Síndrome de Lynch 2, além de apresentar as mesmas características que a SL1, também está associada ao câncer extracolônico, particularmente ao carcinoma de endométrio. Outros tumores têm sido associados com a SL, como ovário, estômago, trato hepatobiliar, pâncreas, ureter, pélvis renal, cérebro e mama, porém em menor frequência (LYNCH et al. 1988; WATSON e LYNCH 1994; RISINGER et al. 1996; BOYD et al. 1999; LYNCH e LYNCH 2000; OLIVEIRA-FERREIRA et al. 2004; LYNCH et al. 2009; DA SILVA et al. 2010).

O HNPCC é caracterizado pelo desenvolvimento precoce de carcinoma colorretal e um risco aumentado de desenvolver um segundo tumor primário em um período de 10 (25%) e 15 anos (50%) após o diagnóstico (BACKES e COHN 2011).

A definição molecular da SL requer a evidência de uma alteração germinativa nos genes de reparo. Essa demonstração pode ser feita por sequenciamento, para verificar a presença de mutação nos genes MMR, por imunistoquímica, para verificar a expressão protéica desses genes, ou por análise de instabilidade de microssatélites (do inglês, *microsatellite instability* - MSI), para avaliar a presença de alterações na ação das proteínas de reparo.

São utilizados testes diagnósticos de triagem para avaliar mutações germinativas nos genes de reparo (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6* e *PMS2*) em pacientes com HNPCC ou SL. A identificação dessas mutações é realizada a partir da metodologia de sequenciamento. Como a metodologia de triagem para mutações por sequenciamento é uma técnica de elevado custo, uma alternativa é avaliar a expressão das proteínas de reparo e realizar a análise de MSI, antes de verificar a presença de mutações germinativas nos genes MMR.

A análise da expressão das proteínas *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* e *PMS2* por imunistoquímica é realizada para a identificação da presença ou ausência de marcação nuclear nas células tumorais. Em alguns casos, a ausência de marcação da proteína *MLH1* é resultado de hipermetilação da região promotora do gene. Porém, em muitos casos, a ausência de marcação dessa proteína e das proteínas *MSH2*, *MSH6* e *PMS2* resulta na presença de mutação nos respectivos genes (GARG e SOSLOW 2012). Embora a análise destas proteínas não seja um teste diagnóstico, ela é utilizada como teste de triagem na avaliação dos pacientes com HNPCC. A

análise de MSI é realizada pela PCR utilizando-se cinco pares de iniciadores estabelecidos no *Workshop Internacional de HNPCC* em Bethesda (BOLAND et al. 1998). Dois pares de iniciadores amplificam região de repetições de mononucleotídeos (BAT25 e BAT26) e três pares, repetições de dinucleotídeos (D2S123, D5S346 e D17S250). As reações podem ser realizadas utilizando-se tecidos tumorais frescos ou parafinados (BOLAND et al. 1998). Após as reações, os tumores podem ser classificados em alto-MSI (MSI-H), quando dois ou mais marcadores apresentam MSI, baixo-MSI (MSI-L), quando apenas um marcador apresenta MSI e estável-MS (MSS), quando nenhum marcador apresenta MSI (BOLAND et al. 1998).

Os principais genes de reparo descritos como associados a SL são *mutL homolog 1 (MLH1)*; mapeado em 3p21), *mutS homolog 2 (MSH2)*; 2p16), *postmeiotic segregation increased 1 (PMS1)*; 2q31-q33), *post meiotic segregation increased 2 (PMS2)*; 7p22), *mutS homolog 6 (MSH6)*; 2p15) e *mutL homolog 3 (MLH3)* (PELTOMÄKI e VASEN 1997; VASEN et al. 1999). Os genes MMR estão relacionados à correção de danos que ocorrem durante a síntese de DNA e participam das etapas iniciais da resposta apoptótica a diferentes tipos de danos ao DNA.

Entre os portadores de mutação nos genes de reparo a danos no DNA, mais de 90% correspondem a alterações germinativas nos genes *MLH1* e *MSH2* (DE LA CHAPELLE 2005; BIANCHI et al. 2011). Mutações nos genes MMR conferem um risco cumulativo entre 70% a 90% de desenvolver CCR e, entre mulheres, há um risco adicional, de 25% a 60%, de desenvolver câncer de endométrio (VASEN et al. 2001; UMAR et al.

2004; MACDONALD 2011). Em 2008, o banco de dados InSiGHT (<http://www.insight-group.org>), registrou mais de 500 mutações patogênicas diferentes, 39% relacionadas ao *MLH1*, 40% ao *MSH2*, 16% ao *MSH6* e 6% ao *PMS2* (NILBERT et al. 2008). Em abril de 2012, esse banco de dados tem registrado 2809 mutações (patogênicas e não patogênicas) sendo 1100 no gene *MLH1*, 940 no *MSH2*, 547 no *MSH6* e 222 no *PMS2*.

Em 2002, MÜLLER et al. investigaram MSI em 27 pacientes positivas para mutações germinativas nos genes *MLH1* ou *MSH2* e que apresentavam câncer de mama e colorretal. Foi identificada alta-MSI nos tumores colorretais, porém os tumores mamários não apresentaram MSI. Com isso, os autores sugeriram que o tumor mamário não está associado aos pacientes portadores da SL. Em 2003, DE LEEUW et al. relataram que 7/11 pacientes portadores de mutações germinativas nos genes *MLH1*, *MSH2* e *MSH6* e com câncer de mama diagnosticadas como famílias SL apresentaram tumores com alta-MSI. Dessa maneira, os autores sugerem que a deficiência do sistema de reparo ao DNA esteja envolvida com a progressão acelerada do tumor mamário em estágios avançados da tumorigênese em pacientes com a SL.

Em um estudo brasileiro, OLIVEIRA-FERREIRA et al. (2004) relataram que 26,5% das mulheres com famílias diagnosticadas com HNPCC desenvolveram tumores de mama. Entre famílias com câncer colorretal familiar, os autores descreveram que o tumor de mama também foi o mais frequente (27,8%). Em um estudo com pacientes diagnosticados com HNPCC, de acordo com os critérios de Amsterdam I ou II, DA SILVA et al.

(2010) relataram que o tumor extracolônico de maior frequência entre as mulheres foi o de mama, com 32/123 casos, seguido de outros 12 tipos tumorais. O câncer de endométrio, tumor extracolônico de maior frequência em outros países, foi identificado em apenas 20/123 casos (16%). No estudo de BUERKI et al. (2012), o câncer de mama foi o segundo tumor extracolônico de maior frequência entre os pacientes portadores de Síndrome de Lynch (11,8%). Os autores também relataram que a incidência da doença era maior em pacientes positivos para mutação no gene *MSH2* (10,1%) e menor nos *MLH1* positivos (2,7%).

Em um estudo com 87 mulheres sul africanas positivas para a mutações em *MLH1*, BLOKHUIS et al. (2008) relataram que 53% dos tumores extracolônicos eram carcinomas mamários. Os autores sugeriram que os carcinomas mamários fazem parte do espectro de tumores extracolônicos associados à Síndrome de Lynch.

JENSEN et al. (2010) verificaram que 17/20 pacientes com diagnóstico de HNPCC e com alterações nos genes de reparo (análise de instabilidade de microssatélites e de expressão protéica por imunohistoquímica) desenvolveram tumores mamários. Esses tumores foram diagnosticados em idade precoce, em média aos 50 anos, idade esta 10-20 anos antes do diagnóstico dos tumores esporádicos. Além disso, a idade precoce de aparecimento do tumor corresponde à mesma observada ao diagnóstico dos tumores de cólon e de endométrio nos pacientes com HNPCC. Segundo os autores, mesmo que a etiologia do desenvolvimento do câncer de mama em pacientes com HNPCC seja desconhecida, uma

alteração nos genes de reparo pode acelerar o acúmulo de mutações associadas aos genes de câncer de mama e dessa forma, contribuir para a progressão tumoral.

Os critérios diagnósticos para a SL são controversos, devido a variações fenotípicas (WANG et al. 2007). O diagnóstico clínico tem como base os antecedentes familiares de câncer, de acordo com os critérios de Amsterdam, e a suspeita clínica, de acordo com os critérios de Bethesda (VASEN 2005). Porém, o diagnóstico é confirmado por meio de testes moleculares, como análise de mutações nos genes de reparo utilizando a técnica de sequenciamento direto, avaliação da expressão protéica dos genes de reparo por imunistoquímica e avaliação da instabilidade de microssatélites (MSI) (GALA e CHUNG 2011).

Recentemente, foi identificado um subgrupo de famílias que preenchem os critérios clínicos para SL, porém não apresentam mutação nos genes de reparo. Essas famílias têm sido classificadas como Câncer Colorretal Familiar do Tipo "X" (BOLAND 2005; CASE et al. 2008; GALA E CHUNG 2011). Essa síndrome é caracterizada pelo menor risco de desenvolvimento de tumores, desenvolvimento da doença em idade tardia e uma progressão mais lenta de adenoma para carcinoma (KOH et al. 2011; KLARSKOV et al. 2012).

## **1.2 SÍNDROME DE CÂNCER DE MAMA-CÓLON HEREDITÁRIO (HBCC)**

O diagnóstico dos pacientes portadores da Síndrome Hereditária do Câncer Mama-Cólon tem sido realizado de acordo com os Critérios de MEIJERS-HEIJBOER et al. (2003) e NASEEM et al. (2006).

O Critério de MEIJERS-HEIJBOER et al. (2003) recomenda que pelo menos dois parentes de primeiro ou segundo grau da paciente tenham sido diagnosticados com câncer de mama antes dos 60 anos de idade. Além disso, os pacientes devem preencher um dos critérios: 1) Pelo menos um indivíduo diagnosticado com câncer de mama ou de cólon em qualquer idade; 2) Pelo menos um indivíduo com CCR diagnosticado antes dos 50 anos de idade e um parente de primeiro ou segundo grau do paciente com câncer de mama; 3) Pelo menos dois indivíduos diagnosticados com CCR em qualquer idade e um parente de primeiro ou segundo grau do paciente com câncer de mama.

Os critérios definidos por NASEEM et al. (2006) são: (1) presença de um indivíduo diagnosticado com câncer de mama e cólon em qualquer idade além de um caso adicional desses tumores em familiares de primeiro ou segundo grau; 2) presença de um indivíduo diagnosticado com CCR antes dos 50 anos de idade e um membro da família diagnosticado com câncer de mama antes dos 50 anos de idade ou dois parentes com câncer mamário diagnosticado em qualquer idade; 3) história de dois indivíduos diagnosticados com CCR em qualquer idade e pelo menos um membro da

família diagnosticado com câncer de mama antes dos 50 anos de idade ou dois casos de câncer de mama diagnosticados em qualquer idade.

AGARWAL et al. (1986) relataram que mulheres com história de câncer de mama apresentavam um risco duas vezes maior de desenvolver CCR quando comparadas a pacientes sem história. Em 2009, JANG et al. descreveram que mulheres com história familiar de câncer de mama possuem um risco aumentado de desenvolver CCR. Além disso, os autores relataram que esse risco aumentava quando mais de um parente era diagnosticado com câncer de mama antes dos 50 anos de idade. Essa associação sugeriu a existência de uma Síndrome de predisposição hereditária associada ao câncer de mama e colon.

NASEEM et al. (2006) relataram que mutações em genes como o *BRCA1*, *BRCA2*, *MLH1*, *MSH2* ou *CHEK2*, poderiam conferir um elevado risco para o desenvolvimento de tumores de mama ou de cólon em familiares de pacientes com a Síndrome do câncer de mama-cólon.

Alguns estudos relatam que pacientes com mutação no gene *BRCA1* possuem um risco aumentado em 3-4 vezes de desenvolver CCR (FORD et al. 1994; LIPTON et al. 2001). Outros estudos indicam que o risco de pacientes com câncer de mama desenvolver o câncer colorretal é maior do que o encontrado na população sem a doença (FORD et al. 1994; BURKE et al. 1997; OLSEN et al. 1999; LIN et al. 1999). LIPTON et al. (2001) sugeriram que a síndrome de mama-cólon não é resultado somente de mutações nas linhagens germinativas dos genes de predisposição aos tumores de mama (*BRCA1* e *BRCA2*) e cólon (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6* e

*PMS2*). Segundo os autores, é mais provável que o HBCC seja resultado de uma mutação herdada ou somática ainda não conhecida.

VAHTERISTO et al. (2002) e SCHUTTE et al. (2003) identificaram 1,1% de pacientes saudáveis com a mutação em 1100delC no gene *CHEK2*. Por outro lado, 5,1% dos pacientes com câncer de mama e negativos para mutação nos genes *BRCA1* e *BRCA2* apresentavam essa deleção, o que aparentemente conferiu um aumento duas vezes maior no risco do desenvolvimento da doença. DE JONG et al. (2005) observaram que essa deleção também estava associada a um aumento no risco de desenvolver CCR.

MEIJERS-HEIJBOER et al. (2003) verificaram que em algumas famílias de pacientes que apresentavam deleção no gene *CHEK2* e que foram diagnosticadas com carcinoma mamário também desenvolveram câncer colorretal. Os autores observaram que 18% dos 55 familiares com HBCC apresentavam a mutação 1100delC no gene *CHEK2*, enquanto que apenas 4% de 380 familiares sem HBCC apresentavam essa mutação. Com isso, os autores deram evidências de que esta alteração genética está associada à síndrome HBCC. A mutação 1100delC no gene *CHEK2* promove o bloqueio da função quinase da proteína (KILPIVAARA et al. 2003).

Há poucos estudos envolvendo pacientes e, principalmente, familiares com a Síndrome Hereditária do Câncer de Mama e Cólon. Essa é uma doença pouco conhecida e controversa, pois não há relatos de genes de alta ou moderada penetrância responsáveis pelo desenvolvimento e

predisposição desses tumores. Com isso, é possível que alterações em genes ainda não descritos possam atuar como fatores de predisposição a Síndrome Hereditária do Câncer de Mama e Cólon.

### **1.3 VARIAÇÃO NO NÚMERO DE CÓPIAS GENÔMICAS (CNVS)**

As variações genômicas mais comuns são os SNPs (do inglês, *single nucleotide polymorphisms*), VNTRs (do inglês, *variable number of tandem repeats*), presença ou ausência de elementos de transição (elementos Alu) e alterações estruturais (deleções, duplicações e inversões) (XU et al. 2011).

As variações no número de cópias genômicas são alterações estruturais que envolvem fragmentos de DNA de um kilobase (Kb) a vários megabases (Mb), representando aproximadamente 13% do genoma humano (REDON et al. 2006; BECKMANN et al. 2007; STANKIEWICZ e LUPSKI 2010). Segundo o banco de dados DGV (<http://projects.tcag.ca/variation/>), as CNVs compreendem pelo menos 25% do genoma humano (XU et al. 2011). Por serem tão abundantes e por ocorrerem numa frequência de 100-10.000 vezes maior do que as mutações em ponto, as CNVs representam uma importante fonte de variabilidade genética e fenotípica, sendo responsáveis por muitas doenças complexas, como câncer, diabetes, obesidade, doenças autoimunes e doenças neurológicas (DISKIN et al. 2009; FANCIULLI et al. 2010; MILLS et al. 2011; XU et al. 2011). Dados atuais em literatura indicam que as CNVs podem

contribuir para a patogênese e progressão de muitos tumores (XU et al. 2011).

As CNVs são alterações germinativas que englobam milhares de genes e podem ocorrer como evento *de novo* (ocorrendo pela primeira vez na linhagem celular dos pais) ou serem herdadas (OSTROVNAYA et al. 2010). As CNVs estão preferencialmente localizadas próximas às regiões conhecidas como LCRs (do inglês, *low copy repeats*) ou duplicons. As LCRs são fragmentos de DNA maiores que 1 Kb e que apresentam homologias de sequências entre si superiores a 90%. Quando as LCRs são maiores que 10 Kb e apresentam mais de 97% de homologia, elas podem ser responsáveis pela instabilidade genômica local, podendo estimular ou mediar rearranjos genômicos constitucionais (recorrente ou não recorrente) ou somáticos (BRAUDE et al. 2006; HASTINGS et al. 2009; STANKIEWICZ e LUPSKI 2010).

Como as CNVs representam variações estruturais do genoma que incluem perdas (deleções) ou ganhos (inserções ou duplicações) de regiões cromossômicas, elas podem alterar a dosagem gênica interferindo na estrutura e na regulação da expressão de genes supressores de tumor e/ou oncogenes, e assim, desempenham um papel importante na predisposição a doenças, como o câncer e na resposta a terapias (ESTIVILL e ARMENGOL 2007; XU et al. 2011).

Recentemente, as CNVs foram divididas em dois grupos: comuns e raras. As CNVs comuns (CDCV - doença comum, variante comum) são encontradas em >5% da população e influenciam no risco para o

desenvolvimento de algumas doenças, porém, estão pouco relacionadas com a herdabilidade. As CNVs raras (CDRV - doença comum, variante rara) são encontradas em menos de 1% da população e podem agir como fatores de suscetibilidade dominante independente, sendo responsável por um aumento significativo no risco de desenvolver câncer (KUIPER et al. 2010; NISHIYAMA et al. 2011).

Os resultados atuais indicam que a maioria dos indivíduos, normais ou não, possuem um número de CNVs superior ao sabido (SHELLING e FERGUSON 2007). De acordo com SHLIEN e MALKIN (2010), as CNVs frequentemente encontradas na população saudável ou controle, podem ter um importante papel no início da carcinogênese. BRAUDE et al. (2006) demonstraram que 10% dos indivíduos normais apresentavam ganhos ou perdas genômicas mapeadas em 14q12, porém essa incidência aumentava para 72% nos pacientes diagnosticados com leucemia mielóide crônica.

Nos últimos anos, muitos estudos têm demonstrado uma relação entre as CNVs e a suscetibilidade ao câncer. Com relação ao câncer colorretal, em 2010, THEAN et al. identificaram uma CNV em 3q26 em famílias diagnosticadas com câncer colorretal familiar e negativas para mutação no gene *APC*. Como não havia gene mapeado nesta região de CNV, os autores realizaram uma avaliação a 2 Mb da região genômica, na qual detectaram o gene *PPM1L*. Este gene é responsável pela codificação de uma serina-treonina fosfato e atua nas vias de sinalização do TGF $\beta$  e BMP. Depois de uma análise de expressão do transcrito e identificação de baixa expressão do mesmo, os autores sugeriram que a região de CNV

contém um elemento *upstream* que regula a expressão de um gene candidato a supressor tumoral. Os autores apresentaram um novo mecanismo envolvido em tumores colorretais associados à mutação negativa no gene *APC*.

Em 2011, VENKATACHALAM et al. utilizando a metodologia de CGH *array*, identificaram novas CNVs mapeadas nos genes *CDH18*, *GREM1*, *BCR* envolvendo três pacientes com suspeita de CCR familiar ou hereditário. Os pacientes selecionados para o estudo apresentaram um dos itens a seguir (1) diagnóstico de CCR até os 40 anos, (2) diagnóstico de CCR antes dos 50 anos e apresentaram pelo menos dois parentes de primeiro grau com a doença, (3) diagnóstico de CCR antes dos 50 anos com um padrão suspeito de herança recessiva (por exemplo, irmãos afetados, porém os pais não possuíam a doença), (4) diagnóstico de CCR antes dos 60 anos com pelo menos três parentes de primeiro grau com a doença. Os autores também identificaram por CGH *array*, duas perdas genômicas envolvendo o hsa-mir-491 e o hsa-mir-646, mapeados nos genes *KIAA1797* e *AK309218*, respectivamente. Essas alterações foram confirmadas por MLPA (do inglês, *multiplex ligation-dependent probe amplification*) em um grupo independente de pacientes diagnosticados com CCR antes dos 40 anos. Foram verificados polimorfismos na estrutura *stemloop* e no microRNA maduro codificado pelo hsa-mir-646. Segundo os autores, as CNVs germinativas identificadas nos pacientes com CCR revelaram genes candidatos de suscetibilidade ao CCR.

Uma variedade de estudos em câncer de mama esporádico tem demonstrado frequentes variações no número de cópias genômicas

englobando genes supressores tumorais e oncogenes envolvidos no desenvolvimento e progressão do carcinoma mamário. Porém, há poucos estudos em pacientes com cânceres familiares.

Recentemente, um grupo de pesquisadores brasileiros relatou que o número de CNVs raras em pacientes com Síndrome de Mama-Ovário, negativas para mutação nos genes *BRCA1* e *BRCA2*, é superior ao de pacientes saudáveis, sem história pessoal e familiar de câncer. Além disso, identificaram perdas genômicas raras exclusivas do grupo amostral envolvendo genes potencialmente associados com a suscetibilidade, desenvolvimento e progressão do câncer, como o *ST6GALNAC5*, *KIA1797* e *miR491*. O gene *ST6GALNAC5*, mapeado em 1p31.1, é responsável por mediar o processo de metástase cerebral em pacientes com câncer de mama. A região cromossômica, onde se mapeiam *KIA1797* e o *miR491*, foi previamente identificada como alterada em um estudo envolvendo pacientes com câncer colorretal (KREPISCHI et al. 2012a).

Para o nosso conhecimento, não há estudos avaliando CNVs em pacientes e em familiares com diagnóstico de Síndrome Hereditária do Câncer de Mama e Cólon. Dessa maneira, este estudo é inédito e poderá auxiliar na classificação clínica e identificação, por métodos moleculares, de pacientes com essa doença.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO PRINCIPAL**

- ✓ Identificar alterações no número de cópias genômicas possivelmente associadas com a etiologia da Síndrome de Câncer de Mama e Cólon Hereditário.

### **2.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS**

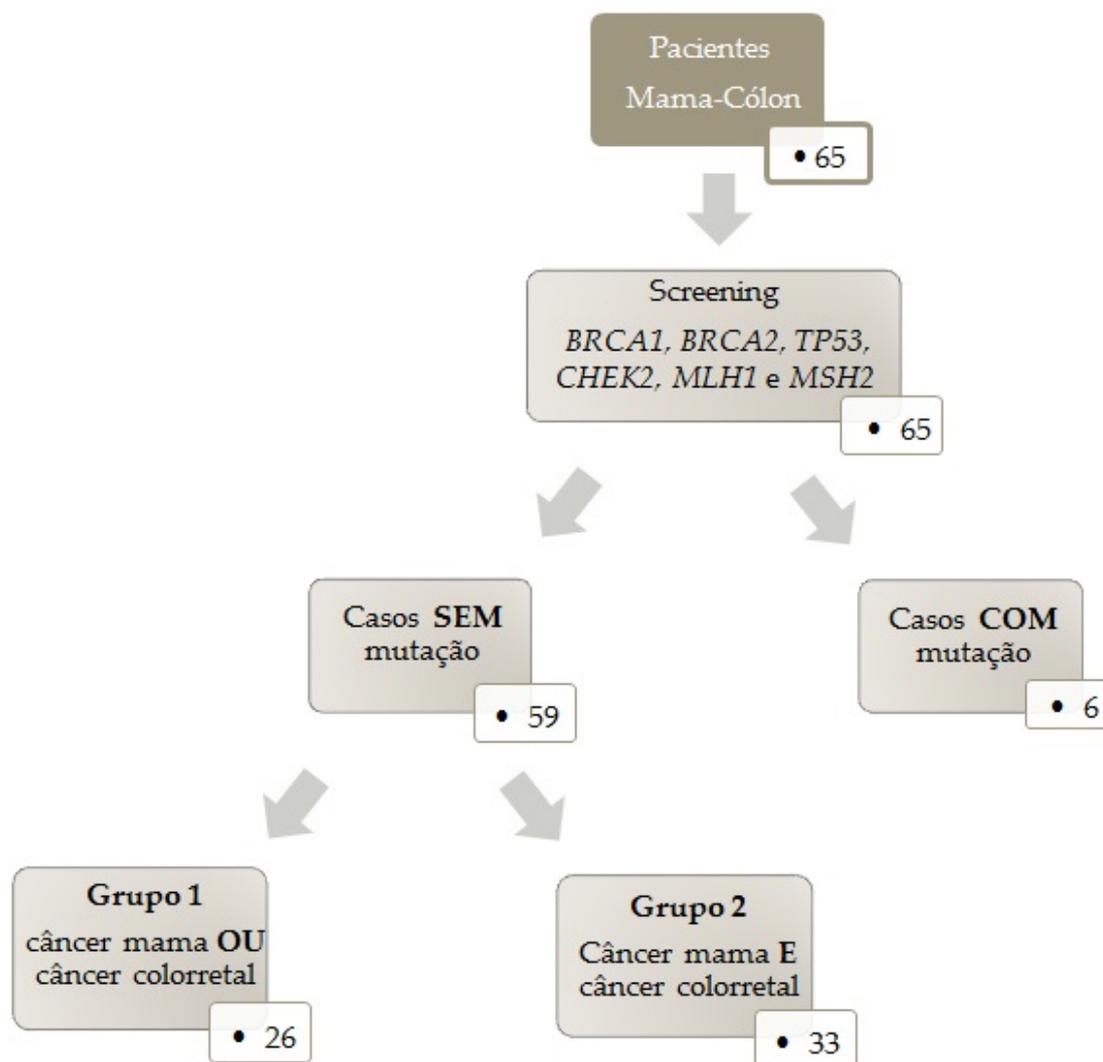
- ✓ Comparar as CNVs com informações disponíveis no banco de dados DGV e com as CNVs do grupo referência, composto por 100 mulheres saudáveis da população brasileira) (dados fornecidos pela Dra Ana C. Krepischi - KREPISCHI et al. 2012a);
- ✓ Identificar a função e o envolvimento dos genes identificados nas CNVs em processos tumorais;
- ✓ Em casos particulares, avaliar se os genes mapeados nas CNVs segregaram entre os familiares dos probandos (afetados e não afetados por câncer).

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS**

O grupo amostral desse estudo faz parte do Registro de Carcinomas Colorretais do Hospital do Câncer A.C. Camargo, SP. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital A.C. Camargo, SP (Registro CEP Nº: 1175/08). Todas as pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

A casuística deste projeto consiste em 65 pacientes diagnosticadas com câncer de mama e/ou colorretal, 20 familiares oriundos de oito famílias e uma amostra de tecido tumoral. O grupo amostral foi dividido em dois grupos: pacientes negativos para mutações em genes de predisposição para o câncer de mama e colorretal e pacientes positivos para mutações nesses genes (Figura 1).



**Figura 1** - Fluxograma representando os três subgrupos referente ao grupo amostral.

O grupo 1 é composto por 26 pacientes diagnosticadas com câncer de mama **ou** cólon e cinco parentes provenientes de três famílias. O grupo 2 é formado por 33 pacientes com câncer de mama **e** colón e nove parentes provenientes de quatro famílias. O grupo 3 é composto por seis pacientes positivas para mutações em genes de predisposição ao câncer de mama e colorretal e seis parentes provenientes de uma família.

Foram considerados no estudo os dados clínicos e histórico familiar das pacientes com o critério estabelecido para a Síndrome Hereditária do Câncer de Mama-Cólon (SHCMC), o qual está em uso no Serviço de Oncogenética e é integrante do Registro de Carcinomas Colorretais do Hospital de Câncer AC Camargo, São Paulo.

Os critérios adotados para a síndrome hereditária do câncer de mama-cólon (SMC) foram:

- SMC1: tumor primário de mama e cólon em qualquer idade ou
- SMC2: diagnóstico de câncer de mama com um familiar (primeiro, segundo ou terceiro grau) com câncer colorretal ou
- SMC3: diagnóstico de câncer colorretal com um familiar (primeiro, segundo ou terceiro grau) com câncer de mama.

Além do critério estabelecido para este estudo, existem outros dois critérios descritos em literatura para a Síndrome Hereditária do Câncer de Mama-Cólon: critério de MEIJERS-HEIJBOER et al. (2003) e critério de NASEEM et al. (2006).

#### Critério de MEIJERS-HEIJBOER et al. (2003)

Dois indivíduos com câncer de mama (parente de primeiro e segundo grau) com pelo menos um caso diagnosticado antes dos 60 anos de idade e um dos itens abaixo:

- SMCMH1: pelo menos um indivíduo com câncer de mama e colorretal diagnosticados em qualquer idade;

- SMCMH2: pelo menos um indivíduo com câncer colorretal diagnosticado antes dos 50 anos de idade e um parente de primeiro ou segundo grau com câncer de mama;
- SMCMH3: pelo menos dois indivíduos com câncer colorretal diagnosticados em qualquer idade, parente de primeiro ou segundo grau com câncer de mama.

Critério de NASEEM et al. (2006)

Pelo menos um dos itens abaixo:

- SMCN1: um indivíduo com câncer de mama e colorretal em qualquer idade e um caso de câncer de mama ou colorretal em parente de primeiro ou segundo grau;
- SMCN2: um indivíduo com câncer colorretal diagnosticado antes dos 50 anos de idade e um parente com câncer de mama antes dos 50 anos ou dois parentes com câncer de mama em qualquer idade;
- SMCN3: dois indivíduos com câncer colorretal diagnosticados em qualquer idade e pelo menos um parente com câncer de mama antes dos 50 anos ou dois casos com câncer de mama em qualquer idade.

A classificação dos pacientes com Síndrome Hereditária do Câncer de Mama-Cólon, baseada na história familiar de câncer descrita nos heredogramas de cada paciente (Anexo 1), está detalhada nas tabelas 1 a 3.

As informações clínicas e histopatológicas das pacientes, como idade, estadiamento clínico, história de câncer familiar, recorrência, presença ou

ausência de metástases, foram obtidas com a colaboração do Dr. Benedito Mauro Rossi, Dra. Erika Maria Monteiro Santos e Dra. Maria Isabel Achatz, Hospital do Câncer AC Camargo, SP. Essas informações estão descritas nas tabelas 1, 2 e 3, referentes aos grupos 1, 2 e 3, respectivamente.

**Tabela 1 - Dados clínicos e histopatológicos das pacientes do grupo 1.**

Casos	Critério	1º Tumor Primário	Idade (anos)	Outros tumores	TNM	Tipo Histológico	ER/PR/HER2	Parentes afetados
SM4	SMC2, SMCMH1, SMCN1, SMO3	Ca mama	48	-	T2N2M0	CLI	+/+ / +	Irmã: mama; Mãe: tireóide; 2 Tias (P): mama; Tia (P): mama, CCR
SM5	SMC2, SMCMH3, SMCN2, SMO2	Ca mama	36	-	T2N0M0	CDI	+ / + / -	Tio (P): CCR; 2 Tias (P): mama; Tia (P): CCR
SM10	SMC2, SMCN3, SMO5	Ca mama	52	-	T1N1M0	CP	+ / + / +	3Tios (P)/3 Primas (P): CCR; Prima (P): mama; Tio (P): fígado
SM11	SMC2, SLY4, SMO5	Ca mama	53	Endométrio (40a)	TxNxM0	CDI	ig	Mãe/Filha: mama; Tio (M): pulmão; Tio (M): CCR; Tio (M): cabeça e pescoço
SM26	SMC3	CCR	78	-	T3N0M0	ADNT	nsa	Filha/Sobrinha/Prima (P)/Tia (P): mama; Sogra: ovário, pele
SM28	SMC2, SMCN2, SMO1	Ca mama	35	Bexiga (45a)	T3N0M0	CDI	- / - / +	Mãe: bexiga, reto; Avô (M): bexiga
SM38	SMC2, SMCMH2, SMCN2, SMO4	Ca mama bilateral	42/47	-	TxN0M0	CDI	+ / + / ig	Avó (M): mama; Irmã: CCR
SM44	SMC3, SMCNH2, SMCN2, SLY3	CCR	45	-	TxNxM0	ADNT	nsa	Mãe/Irmã/2 Sobrinhas (M): mama
SM48	SMC2, SMO2	Ca mama	36	-	TxNxM0	CDI	ig/ig/ig	Mãe/Tia (M)/ Bisavó (M): mama; Tia (M): tireóide; Tio (M): CCR; Avô (M): próstata;
SM56	SMC2, SMCN3, SMO5	Ca mama	50	-	TxNxM0	-	ig/ig/ig	Tio (M)/Tia (M): CCR; Irmã/1 Prima (M): endométrio; 2 Primas (M): mama; Avô (M): laringe
SM60	SMC2, SMO1	Ca mama	40	-	T2N0M0	CDI	+ / + / -	Tia (M): pulmão; Tia (M): CCR
SM65	SMC3	CCR	62	-	T2N0M0	ADNT	nsa	Mãe: mama; 2 Primas (M): mama
SM70	SMC3, SMCMH3	CCR	60	-	T3N0M0	ADNT	nsa	Pai: próstata; Mãe: mama; Tia (M): CCR; Avó (P): tireóide; Irmã: mama bilateral
SM71	SMC3	CCR	52	Linfoma (54a)	T2N0M0	ADNT	nsa	Irmão: pulmão; Irmã: mama; Tio (P): garganta
SM76*	SMC2	Ca mama	39	-	TxN0M0	CDI	ig/ig/ig	-
SM78	SMC3, SMCMH1, SMCN1	CCR	43/51	-	T2N1M0	ADNT	Nsa	Mãe: CCR; 2 Tios (M): próstata; 2 Primas (M): mama
SM83	SMC2, SMCN3, SMO2	Ca mama	35	-	T4N0M0	CDI	+ / + / -	Irmãs: displasia mamária; Mãe: metaplasia esôfago; Avó (M): estômago; Tia (M): mama; 2Tios avô (M): estômago; Tio avô (M): pulmão; Tio avô (M): intestino; Tio avô (M): ossos; Tia avó (M): mama

**Cont/ Tabela 1**

Casos	Critério	1º Tumor Primário	Idade (anos)	Outros tumores	TNM	Tipo Histológico	ER/PR/HER2	Parentes afetados
SM91	SMC2, SMCMH3, SMCN3, SMO2	Ca mama bilateral	38/39	-	TxN0M0	CDI	ig/ig/ig	Pai/Irmão: CCR; Tia (P): mama; Irmã: mama bilateral
SM92	SMC3, SMCN1, SLY3	CCR	47	-	T3N0M0	ADNT	nsa	Mãe: mama; Tio(M): CCR; Tia (M): mama, CCR; Avô (M): pulmão
SM98	SMC2, SMCN3, SMO2	Ca mama	30	-	T1N0M0	CDI	ig/-/+	Tia (M)/Prima (M): mama; Tia (M)/Tio avô (M): CCR; Tia avó (M): pâncreas; Tio avô (M): pulmão
SM165	SMC2, SMO1	Ca mama	27	-	T1N1M0	ADN	+/+/+	Tio (M): CCR
SM173	SMC2, SMO1	Ca mama	38	-	ig	-	ig	Irmão: CCR; Pai: próstata; Tia (P): ovário; Primo (P): pulmão
SM174	SMC3	CCR	54	-	T3N0M0	ADNS	nsa	Irmã: ovário; Irmã: mama; Irmão: próstata; Tio (P): fígado
SL155	SMC3, SMCN1	CCR	46	-	T3N2M0	ADNS	nsa	Pai/Primo (P): CCR; Tio (P): pulmão; Tia (P)/Prima (P): mama
SL167	SMC3, SMCN1	CCR	40	-	T2N0M0	ADN	nsa	Tio (M): CCR; Tia (M): mama; Primo (M): linfoma; Tio (P): pulmão; Avô (P): boca
VCS	SMC2, SMO3	Ca mama (bilateral)	29	-	T2N2M0	CDI	+/+/-	Irmã: mama; Pai, Tio (P), Avô (P): renal; Tio (P): leucemia; Tia (P): ovário; Avó (P): pâncreas; Avô (M): CCR

**Legenda.** \*paciente SM76 não possui heredograma. SMC: Síndrome Mama-Cólon; SMCMH: Síndrome Mama-Cólon Meijers-Heijboer; SMCN: Síndrome Mama-Cólon Naseem; SMO: Síndrome Mama Ovário; SLY: Síndrom de Lynch; Ca: carcinoma; CCR: câncer colorretal; a: anos; M: origem materna; P: origem paterna; CLI: carcinoma lobular invasivo; CDI: carcinoma ductal invasivo; CP: carcinoma papilífero; CDIS: carcinoma ductal in situ; ADNT: adenocarcinoma tubular; ADN: adenocarcinoma; ADNS: adenocarcinoma de sigmoide; nsa: não se aplica; ig: ignorado ou não avaliado.

**Tabela 2 - Dados clínicos e histopatológicos das pacientes do grupo 2.**

Casos	Critério	1º Tumor Primário (id)	TNM	Tipo Histológico	2º Tumor Primário (id)	TNM	Tipo Histológico	Outros tumores	ER/PR/HER2	Parentes afetados
SM6	SMC1	CCR (73a)	TxNxM0	ig	Ca mama (74a)	TisN0M0	CDIS	-	+/-/-	Mãe: útero
SM7	SMC1, SMCN1, SMO9	Ca mama (54a)	TxNxM0	ig	CCR (56a)	T1N0M0	ADNT	GIST (60a)	Ig	Irmão: bexiga; Tia (M): mama; tia (M): pele
SM9	SMC1, SMCN1, SLY3, SMO1	Ca mama (44a)	TxN2M0	CDI	CCR (48a)	T2N0M0	ADNT	ADN (49a)	+/-/-	Tia (M): CCR; Tia (P): melanoma; Avó (M): bexiga
SM12	SMC1, SMCN1, SLY3, SMO2	CCR (41a)	TxN0M0	ig	Ca mama (42a)	TisN0M0	CDI	Ovário (43a)	+/-/-	Tia (P)/prima (P): mama; Primo (P): melanoma
SM14	SMC1, SMO1	Ca mama (37a)	TxNxM0	ig	CCR (46a)	TxN0M0	ADNT	-	Ig	Irmã: CCR, FAP; Irmão: FAP, gástrico; Irmão/Mãe: CCR; Pai: retal
SM19	SMC1, SMCN1, SMO9	Ca mama (60a)	TxNxMx	CDI	CCR (71a)	-	-	-	Ig	Pai: estômago; Mãe: útero; Irmã: mama
SM23	SMC1, SMCN1, SLY7, SMO9	CCR (59a)	T2N1M0	ADNT	Ca mama (64a)	T1N0M0	CDI	-	-/-/-	Mãe: ovário; Irmão: CCR
SM30	SMC1, SMO9	Ca mama (56a)	T1N0M0	CDI	CCR (62a)	T3N2M0	ADNT	-	Ig	Pai: laringe; Mãe: pulmão, Avó (M): mama
SM33	SMC1	Ca mama (49a)	TxNxM0	CDI	CCR (74a)	T3N0M0	ADNT	-	Ig	-
SM34	SMC1, SMCN1, SMO5	Ca mama (56a)	T4N0M0	CDI	CCR (58a)	T2N0M0	ADNT	-	Ig	2 Primas (P)/irmã: mama; Irmão: estômago
SM37	SMC1, SMCN1, SMO5	CCR (52a)	TxNxM0	ADNT	Ca mama (73a)	TisN0M0	CLI	-	Ig	Pai: próstata; 2 Irmãs/filha/sobrinha: mama; Sobrinho, tio (P): fígado
SM47	SMC1	CCR (70a)	TxN1M0	ADNT	Ca mama (76a)	T4N2M1	CDI	-	+/-/-	Pai: cabeça e pescoço; Irmão: fígado
SM57	SMC1	Ca mama (67a)	TxNxM0	ig	CCR (68a)	T0N0M0	ADNT	-	ig	-
SM59	SMC1, SMCN1	Ca mama (57a)	T2N0M0	CDI	CCR (57a)	T3N2M0	ADNM	-	Ig	Irmão: leucemia; Tia (M): CCR, útero, mama; Tia (P): mama; Tia (P): útero
SM63	SMC1	Ca mama (52a)	T2N2M0	CDIS	CCR (57a)	T2N2M0	ADNT	-	+/-/-	Irmão: pulmão
SM64	SMC1, SMCN1, SMO9	Ca mama bilateral (55a)	T2N2M0	CDI	CCR (57a)	T2N2M0	ADNT	-	+/-/-	Irmã: tireóide; Irmã: mama, CCR; Tia (M): osseo
SM67	SMC1, SMCN1, SMO3	Ca mama (48a)	TxN0M0	CDI	CCR (56a)	T3N2M0	ADNT	-	ig	Irmã: mama bilateral; Mãe: mama, pâncreas; Primo (M): CCR; 2 Primas (P): mama
SM77	SMC1, SMCN1	Ca mama (92a)	T1N0M0	CDI	CCR (92a)	T3N0M0	ADNT	-	+/-/-	Filha: CCR; Filho: CCR, pâncreas; Sobrinha: mama
SM87	SMC1, SMCN1	Ca mama (88a)	T1N0M0	CDI	CCR (88a)	T4N0M0	ADNT	-	+/-/-	Irmã: mama
SM88	SMC1	Ca mama (52a)	T2N0M0	CDI	CCR (69a)	T4N0M0	ADNT	Melanoma (51a)	ig	Tia (M): pulmão; Irmã: laringe; Prima (M): mama; Prima (M): osseo

## Cont/ Tabela 2

Casos	Critério	1º Tumor Primário (id)	TNM	Tipo Histológico	2º Tumor Primário (id)	TNM	Tipo Histológico	Outros tumores	ER/PR/HER2	Parentes afetados
SM100	SMC1, SMCN1, SMO5	CCR (56a)	TxN0M0	ADNT	Ca mama (76a)	TxNxM0	CDI	-	ig	Pai: pâncreas; Mãe/avó (M): endométrio; Tio (M): melanoma; Irmã/prima (P): mama; Tia (M): gástrico; Avô (P): esôfago
SM101	SMC1, SMCMH1, SMCN1, SMO2	Ca mama (44a)	T2N0M0	CDI	CCR (55a)	T0N0M0	ADNT	Melanoma (51a)	+/+/-	Mãe: mama; Irmã: mama bilateral
SM150	SMC1, SMCN1, SLY3, SMO2	CCR (42a)	T4N1M0	ADNS	Ca mama (43a)	T2N1M0	CDI	GIST (44a)	-/-/-	Tia (M)/Tio (M): renal; tio (M): pulmão; avô (M): laringe; tio (P): fígado; tio (P): leucemia; tia (P)/Prima (P): mama; tia (P): CCR Mãe: sigmóide; tio (M): CCR; tia (M): meningioma; tia (M): pâncreas; tio (M): próstata; avô (M): pulmão; tia (P): mama bilateral; avô (P): mama
SL16	SMC1, SMCMH1, SMCN1, SMO2	CCR (48a)	ig	ADNT	Ca mama (49a)	ig	CDI	-	ig	Irmã: CCR; tio (M): próstata; tia (M): mama, útero; tia (M): laringe; avô (M): próstata; avô (M): mama, útero; avô (P): próstata
SL24	SMC1, SMCMH1, SMCN1, SMO3	Ca mama bilateral (25,33a)	T2N0M0	CDI	CCR (35a)	TxNxMx	ADN	Ovário (34a)	+/ig/ig	Avó (M): duodeno; tia (M): nódulos mama, tireóide; irmão: adenoma
SL55	SMC1, SMO1	Ca mama (43a)	T2N1M0	CDI	CCR (47a)	T2N1M0	ADNR	-	+/+/+	
SL154*	-	CCR (42a)	-	-	Ca mama (56a)	T2N0Mx	CLI	Endométrio (40a)	+/+/-	Paciente foi adotada
LFS144	SMC1, SMCN1, SMO5	Ca mama (61a)	T2N1M0	CDI	CCR (68a)	T3N1M0	ADNM	-	+/-/+	Avó, 2 Tias (P): ca mama
MT5	SMC1, SMO2	Ca mama (38,42a)	T2N0M0	CDIS	CCR (58a)	-	ADNIS	Melanoma (48a)	-/-/+	Tio (P): próstata; tia avó (M): mama
MT16	SMC1, SMCN1	CCR (37a)	T3N0M0	ADNTP	Ca mama (39a)	T3N0M0	CDIS	Endométrio (45a)	-/-/+	Irmã: CCR
MT28	SMC1	CCR (62a)	T3N0M0	ADNT	Ca mama (65a)	-	CDI	Ovário (62a)	+/+/-	Pai: base língua; mãe: cavidade oral; avô (P): pulmão
MT39	SMC1, SMCN1, SMO9	Ca mama (69a)	-	CDIN	CCR (71a)	-	-	Tireóide (77a)	+/ig/+	Avô (P): gástrico
MT67	SMC1, SMCN1, SMO9	Ca mama bilateral (55a)	T1aN0M0	CLI/CLIS	CCR (56a)	T1N0M0	ADNMD	Tireóide (55a)	+/+/ig	Mãe: mama; tia (M), tia avó (P), bisavô (P), sobrinho (M): CCR; tio (M): cabeça e pescoço; sobrinho (M): sistema nervoso central

**Legenda.** \*paciente SL154 não possui heredograma. SMC: Síndrome Mama-Cólon; SMCMH: Síndrome Mama-Cólon Meijers-Heijboer; SMCN: Síndrome Mama-Cólon Naseem; SMO: Síndrome Mama Ovário; SLY: Síndrome de Lynch; ca: carcinoma; CCR: câncer colorretal; id: idade em anos; a: anos; M: origem materna; P: origem paterna; CLI: carcinoma lobular invasivo; CDI: carcinoma ductal invasivo; CDIS: carcinoma ductal in situ; ADNT: adenocarcinoma tubular; ADN: adenocarcinoma; ADNMD: adenocarcinoma mucinoso; ADNR: adenocarcinoma retossigmóide; ADNIS: adenocarcinoma in situ; ADNMD: adenocarcinoma moderadamente diferenciado; ig: ignorado ou não avaliado.

**Tabela 3 - Dados clínicos e histopatológicos das pacientes do grupo 3.**

Casos	Critério	1º Tumor Primário (id)	TNM	Tipo Histológico	2º Tumor Primário (id)	TNM	Tipo Histológico	Outros tumores	ER/PR/HER2	Parentes afetados
SM41	SMC2, SMCN2, SMO4	Ca mama bilateral (35/41a)	TisN0M0	CDIS	nsa	nsa	nsa	-	+ / + / ig	Irmã: CCR
SM50	SMC1, SMCN1, SLY3, SMO2	Ca mama (36a)	T2N0M0	CDI	CCR (47a)	T4N1M0	ADNT	-	ig	Pai: próstata; Irmã: cerebral benigno; Irmã: mama Mãe/Irmã/3 Tias (M)/Tio (M)/Sobrinha (M)/2 Primas (M): mama; Tio (M): renal; Tio (P)/Tia (P): cólon; Avó (M): útero
SM86	SMC2, SMCN2, SMO2	Ca mama bilateral (45/52a)	T2N0M0	CDI	nsa	nsa	nsa	-	+ / + / +	Mãe: mama e ovário; Irmã/Avó (M)/Tia (M): mama; Tio (M): CCR; Tia (M): linfoma
SM89	SMC2, SMCMH2, SMCN2, SMO2	Ca mama (40a)	T2N0M0	CDI	nsa	nsa	nsa	-	- / - / -	Pai: sistema nervosa central; Tio (P): CCR
SM102	SMC1, SMCN1	CCR (59a)	T0N0M0	ADNT	Ca mama (63a)	T2N0M0	CDI	-	+ / + / -	Filha: CCR; irmã: CCR; mãe: mama; tio (P): CCR
SL36	SMC1, SMCMH1, SMCN1, SMO9	CCR (43a)	T3N0M0	ADN	Ca mama (48,54a)	T2N0M0	CDI, CDIS	-	- / - / ig	CCR

**Legenda.** SMC: Síndrome Mama-Cólon; SMCMH: Síndrome Mama-Cólon Meijers-Heijboer; SMCN: Síndrome Mama-Cólon Naseem; SMO: Síndrome Mama Ovário; SLY: Síndrom de Lynch; ca: carcinoma; CCR: câncer colorretal; id: idade em anos; a: anos; M: origem materna; P: origem paterna; CDI: carcinoma ductal invasivo; CDIS: carcinoma ductal in situ; ADNT: adenocarcinoma tubular; ADN: adenocarcinoma; nsa: não se aplica; ig: ignorado ou não avaliado.

Os dados das Tabelas 1 a 3 mostram que a média de idade ao diagnóstico do primeiro tumor nos pacientes do grupo 2 (53,19 anos) é maior do que a idade do diagnóstico do grupo 1 (43,76 anos). Dessa maneira, verificou-se que os grupos diferem quanto à idade (Teste t de *student*;  $p=0,004$ ). No grupo 1, 19 pacientes desenvolveram tumor antes do 50 anos de idade, quatro entre os 51-59 anos e três acima dos 60 anos. No grupo 2, 13 pacientes desenvolveram o primeiro tumor antes dos 50 anos, 13 entre os 51-59 anos e nove acima dos 60 anos de idade. No grupo 3, cinco pacientes desenvolveram tumor antes dos 50 anos e apenas uma, entre os 51-59 anos (Tabela 4).

**Tabela 4** - Idade do desenvolvimento do primeiro tumor nas pacientes do grupo 1, 2 e 3.

<i>Idade (anos)*</i>	<i>N (%)</i>		
	<b>Grupo 1</b>	<b>Grupo 2</b>	<b>Grupo 3</b>
<b>≤50</b>	19	13	5
<b>51-59</b>	4	11	1
<b>≥60</b>	3	9	0
<b>Total</b>	26	33	6

**Legenda.** \*Idade (em anos) de desenvolvimento do primeiro tumor; N: número de pacientes

Além dos critérios clínicos e histórico familiar, as amostras de sangue periférico de todas as pacientes foram analisadas por sequenciamento direto (ABI 3130, Applied Biosystems) para avaliar mutações nos genes *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2* (1100delC), *TP53*, *MLH1* e *MSH2*. Num estudo prévio, coordenado pelo Dr Benedito Mauro Rossi e Dra Dirce M. Carraro, foram avaliados 136 pacientes para mutações nos genes *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2*

(1100delC) e *TP53*. Neste estudo, foram identificadas 18 mutações patogênicas no gene *BRCA1*, sete no gene *BRCA2*, uma no *CHEK2* e nenhuma no *TP53*. Dos 136 pacientes, 65 preenchem os critérios de Mama-Cólon e foram selecionados para o estudo de triagem de CNVs.

## **3.2 METODOLOGIA**

### **3.2.1 Obtenção de DNA genômico**

O DNA genômico (gDNA) foi obtido a partir de linfócitos do sangue periférico de todos os pacientes e familiares selecionados para o estudo. Em um caso foi também utilizado o gDNA de tecido tumoral (caso SM89). O DNA das amostras foi obtido no Banco de Macromoléculas do Hospital A.C. Camargo, SP, sob a supervisão da Dra Dirce M. Carraro.

A extração de gDNA a partir de sangue periférico foi realizada segundo o protocolo recomendado pelo fornecedor do *Puregene Genomic Purification Kit* – Gentra (Qiagen). O isolamento do gDNA do tecido tumoral foi baseado no método de digestão com 20 mg/uL proteinase K (Sigma) e adição de 1 mL do reagente fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1) (Invitrogen). A precipitação do DNA foi realizada com etanol 100% gelado e acetato de amônio 7M. Após a obtenção do precipitado, o DNA foi eluído em água ultra pura estéril. Em seguida, o gDNA obtido a partir de sangue periférico e tecido tumoral foram quantificados em espectrofotômetro NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) e armazenados a -20°C

### 3.2.2 Sequenciamento dos genes *MLH1*, *MSH2* e *ROBO1*

Como descrito acima, em um subconjunto de casos foi realizada a reação de sequenciamento direto de acordo com a metodologia de Sanger: (1) amplificação dos éxons dos genes *MLH1* e *MSH2* e purificação enzimática do amplicon, (2) incorporação dos ddNTPs e (3) precipitação dos produtos obtidos. Os genes *MLH1* (GeneBank NM\_000249.3), *MSH2* (GeneBank NM\_000251.1) e *ROBO1* (GeneBank NM\_002941.3) foram divididos em 20, 16 e 26 fragmentos correspondentes aos 19, 16 e 31 éxons, respectivamente. Os pares de iniciadores foram desenhados nas regiões intrônicas, com o objetivo de verificar a presença de mutações nos éxons e regiões de *splicing*. Na Tabela 5 estão descritos os iniciadores do gene *ROBO1*. Os iniciadores dos genes *MLH1* e *MSH2* foram disponibilizados pelo laboratório de diagnóstico molecular, coordenado pela Dra Dirce Maria Carraro.

As reações de sequenciamento dos genes *MLH1* e *MSH2* foram realizadas em todos os pacientes deste estudo. Mutações no gene *ROBO1* foram investigadas nas pacientes SM37 e SM56 e seus familiares (SM37-2, SM37-2, SM37-4, SM37-5, SM56-2 e SM56-3).

Na PCR foram utilizados 5 µM de cada iniciador (*forward* e *reverse*), 10 µL de Master Mix (Promega) e 25 ng de gDNA. As condições da PCR estão descritas na Tabela 6.

**Tabela 5** - Iniciadores utilizados no sequenciamento do gene *ROBO1*.

Éxon	Seqüências	Tamanho do Amplicon
2	F: 5' GTTTCTCAGCATAGCTAACC R: 5' GTTTCTCAGCATAGCTAACC	316 pb
3	F: 5' CGTGCTGTGTGTTGTCCTTG R: 5' GGAGGTGGAGGCATTTTCAGG	269 pb
4	F: 5' GGCGGACACCAGAAAGATTGT R: 5' CCACTCCCTCTGCCAAACAC	521 pb
5	F: 5' AGGACTGTATCTATCACTTTTGGGTC R: 5' GGTAAGATACACACAGTTAGACCA	268 pb
6-7	F: 5' CATCTGTCATGTAAACATAGC R: 5' GATGTGGAGATGATGTGATG	751 pb
8	F: 5' GAATGTAGCATGTGCTTTGAAG R: 5' CACTTACAGAGCTCCCATAGG	456 pb
9	F: 5' GACAAGAATTGGTATATCATGACTG R: 5' CAGCTGCATGACTAAGTAATATG	362 pb
10	F: 5' GTGATGGGAGAATACTTAGC R: 5' TATCTACTGGCACCCCTCTC	418 pb
11	F: 5' CATGTCTGCTACTTTAATTAC R: 5' CTACTCTTCATTTAACACTTC	453 pb
12-14	F: 5' GCAGTTATCCATATTCATG R: 5' GTGCAATTATAACATCTAAGG	846 pb
15	F: 5' CTGGCTTGGACTCTTCTTTAC R: 5' CAAGTAGGCAACAGATAGTTAC	331 pb
16	F: 5' GTGTAAGAATGTGGGATGAAG R: 5' CAAGAAAGTTAGTAATTAATGCC	469 pb
17	F: 5' GATATTAATTACCTGCTTTCAGTG R: 5' TACATGTTGCTATTTGGACCAG	319 pb
18	F: 5' GTAGTGCATGACAGTTTAGTAC R: 5' CTACATATTAAGTAAAGCTAACACC	444 pb
19	F: 5' GATGATGGTGAGTGGTGTG R: 5' GAAGTTAATATGTGGATACCGC	499 pb
20-21	F: 5' CATAGATCAGATTGTCAGAACTAC R: 5' GTGGTGTCATTGAGGAAGATG	1.724 pb
22	F: 5' GTGAGCATAACAAGATGAGG R: 5' CATGTAGGGAGAGGGAAAG	335 pb
23	F: 5' CTGATGACTCGCAAAGCTAC R: 5' GACAAGTTTCAACATCTAGTCG	500 pb
24	F: 5' CCTGACAATCTGAATACAACAATAG R: 5' GTCACCTACATACGTCAGTC	357 pb
25	F: 5' CAGTACCTTGCATGTTCTCTTG R: 5' GACCTTAGGAATCAGTCTTCTC	428 pb
26	F: 5' CTCCTTAATGTGACTGAGAACG R: 5' GACTTCATATGTTAATTGCCTGG	530 pb
27	F: 5' GAAGTAAAGGTCAAATCTGCATG R: 5' GTAAGATCATAGGACAGAATCAG	772 pb

**Cont/ Tabela 4**

<b>Éxon</b>	<b>Seqüências</b>	<b>Tamanho do Amplicon</b>
28	<b>F:</b> 5' GCTGGAAGAGTTTGTTTAAG <b>R:</b> 5' CAGTGAATGCATTTGCTAGTCC	3' 3' 382 pb
29	<b>F:</b> 5' GTATCTCGTAGGTGAATGTGGC <b>R:</b> 5' GAGAGCAAACCTTCTTAATCTTACCA	3' 3' 519 pb
30	<b>F:</b> 5' CATTATGCTTATAGAGTGTCCCTC <b>R:</b> 5' CCATCATAGACATTAGAGTACTG	3' 3' 471 pb
31	<b>F:</b> 5' GTTGACATGAGCCCTTTCC <b>R:</b> 5' AGTGCAATGCCATATCTCAG	3' 3' 507 pb

**Tabela 6** - Condições da PCR para os genes *MLH1*, *MSH2* e *ROBO1*.

Gene	Éxons	Condições da PCR
<b><i>MLH1</i></b>		35 ciclos (desnaturação a 95°C por 30 seg, anelamento a T°C por 45 seg, extensão a 72°C por 1 min)
	E16	T= 51°C
	E5	T= 55°C
	E1, E2, E3, E4, E6, E7-8, E9, E10, E11, E12, E13, E14, E15, E17, E18, E19	T= 56°C
<b><i>MSH2</i></b>		35 ciclos (desnaturação a 95°C por 30 seg, anelamento a T°C por 45 seg, extensão a 72°C por 1 min)
	E4	T= 42°C
	E2, E3, E10, E14, E16	T= 47°C
	E9	T= 50°C
	E5, E7, E8, E11	T= 51°C
	E6, E12, E13, E15	T= 52°C
<b><i>ROBO1</i></b>		35 ciclos (desnaturação a 95°C por 30 seg, anelamento a T°C por 45 seg, extensão a 72°C por 1 min)
	E11	T= 55°C
	E20-21	T= 56°C
	E2, E3, E4, E5, E6-7, E8, E9, E10, E12-14, E15, E16, E17, E18, E19, E22, E23, E24, E25, E26, E27, E28, E29, E30, E31	T= 57°C

**Legenda** - E: éxon; T: temperatura específica de *melting*.

O volume de 8,0 µL do produto amplificado foi purificado com a enzima Exo-Sap I (USB/GE), com o intuito de remover os dNTPs e iniciadores, não utilizados na reação de amplificação. A reação de sequenciamento foi realizada com a adição de 1,5 µL 5x *Sequencing Buffer* BigDye *Terminator* v1.1, v3.1, 5 µM do iniciador, 0,75 µL de BigDye® *Terminator* v3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), utilizando-se os

pares de iniciadores específicos para cada fragmento amplificado. As condições da reação de sequenciamento foram desnaturação a 95°C por 2 min, seguidos de 40 ciclos a 95°C por 18 seg, 50°C por 18 seg e 60°C por 3 min e 30 seg.

As amostras foram ressuspendidas em 13 µL de formamida Hi-Di (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), desnaturadas a 95°C em termociclador por 3 min e imediatamente transferidas para recipiente com gelo por 5 min. As reações de sequenciamento foram realizadas no sequenciador ABI Prism 3130 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA).

### ***Análise dos dados de sequenciamento***

As sequências foram analisadas no *Software CLC Genomics Workbench*. Para a identificação das alterações, as sequências dos pacientes foram alinhadas e comparadas com a sequência referência de cada gene, a qual foi obtida no próprio software *CLC Genomics Workbench*.

**Genes *MLH1* e *MSH2*.** As alterações identificadas foram comparadas com os bancos de dados LOVD (*Leiden Open Variation Database - A Colon cancer gene variant database* [http://chromium.liacs.nl/LOVD2/colon\\_cancer/home.php](http://chromium.liacs.nl/LOVD2/colon_cancer/home.php)), *MMR Gene Unclassified Variants Database* (<http://www.mmrmissense.net>), SIFT (*Sorting Intolerant from Tolerant* - <http://blocks.fhcrc.org/sift/SIFT.html>), POLYPHEN (*Polymorphism Phenotyping* - <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>) e Align GVGD ([http://agvgd.iarc.fr/agvgd\\_input.php](http://agvgd.iarc.fr/agvgd_input.php)) para a interpretação e determinação do significado patogênico das alterações detectadas.

As sequências alteradas foram classificadas como patogênicas quando apresentavam um dos seguintes critérios: (1) alteração com efeito deletério na proteína como mutação *nonsense* ou *frameshift*, resultando em um *stop* códon prematuro; (2) mutação em sítios de *splicing*; (3) pequenas inserções ou deleções; (4) mutações *missense* descritas como patogênicas em bancos de dados; (5) nas variantes de significado desconhecido definidas como intolerante e possivelmente ou provavelmente patogênicas pelos programas SIFT (<http://blocks.fhcrc.org/sift/SIFT.html>) e POLYPHEN (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>) respectivamente, tiveram calculados os efeitos das suas proteínas.

**Gene *ROBO1*.** As alterações encontradas foram classificadas de acordo com os seguintes critérios: (1) mutação *nonsense* ou *frameshift*, resultando em um *stop* códon prematuro; (2) mutação em sítios de *splicing*; (3) pequenas inserções ou deleções foram consideradas como possivelmente patogênicas.

### **3.2.3 Hibridação genômica comparativa baseada em *arrays* (aCGH ou CGH *array*)**

Os perfis de variação no número de cópias genômicas e as sequências alteradas consideradas como associados à etiologia da Síndrome de Câncer de Mama-Cólon foram analisados pela metodologia de CGH *array*, utilizando-se a plataforma de 4x180K (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Esta plataforma de oligonucleotídeos apresenta aproximadamente 170.000 sondas de 60pb que mapeiam genes

particularmente envolvidos em câncer e outras sequências codificadoras e não-codificadoras (<http://www.chem.agilent.com>), presentes no banco de dados genômicos UCSC Hg18 (NCBI Build 36, March 2006).

A preparação da amostra do gDNA consistiu na avaliação da concentração e qualidade utilizando o sistema Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE) para assegurar a ausência de proteínas e sais. Após a quantificação, as amostras foram diluídas a uma concentração final de 100 ng/μL. A integridade do gDNA foi avaliada em gel de agarose 0,8% com 500 ng de amostra. Como referência, foi usado gDNA comercial normal (Promega, Mennheim, Germany).

Os procedimentos de digestão, marcação e hibridação foram realizados de acordo com as instruções recomendadas pelo fornecedor (Agilent Technologies). As amostras foram submetidas a uma etapa de digestão enzimática randômica em reação contendo 2,2 μL de água ultra-pura estéril, 2,6 μL de tampão de reação 10X, 0,5 μL das enzimas *Alu I* e *Rsa I* 10u/μL (Promega, Madison, WI). A reação foi incubada a 37°C por 2 horas, 65°C por 15 min e mantida em gelo durante o procedimento. O tempo de digestão das amostras foi determinado após avaliação da integridade do gDNA em gel de agarose.

Em seguida, os DNAs testes e referência foram marcados diferencialmente com Cy3<sup>TM</sup>-dUTP and Cy5<sup>TM</sup>-dUTP, respectivamente, em uma reação baseada no uso de iniciadores randômicos e na atividade da enzima *Exo-Klenow* (Agilent Technologies). Essa reação foi realizada a 37°C

por 2 horas e 65°C por 15 min. Foi realizada a purificação das amostras com o intuito de remover as cianinas não incorporadas ao gDNA, utilizando-se *Illustra ProbeQuant G-50 Micro Columns* (GE Healthcare). A purificação foi realizada de acordo com as instruções do fabricante. Após a purificação, os gDNAs marcados foram quantificados em Nanodrop ND-1000 Spectrophometer com o objetivo de calcular a eficiência da reação de marcação. A hibridação das amostras foi realizada segundo os valores de eficiência descritos no protocolo da Agilent Technologies. Amostras dos casos e de referência eram avaliados quanto a eficiência (Cy3<sup>TM</sup>-dUTP: 25-40 pmol/μL; Cy5<sup>TM</sup>-dUTP: 20-35 pmol/μL) e combinados na razão de 1:1.

Em seguida, as amostras foram precipitadas em 19,5 μL de acetato de amônio 3M, 300 μL de EtOH 100% gelado e 5 μL de Human Cot-11mg/mL (Invitrogen, Life Technologies). Os mesmos permaneceram 10-20 min a temperatura de -80°C, seguido de centrifugação a 14.000 rpm por 30 min a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e foi adicionado 1 mL de EtOH 70% gelado, seguidos de homogeneização por inversão e centrifugação a 14.000 rpm por 15 min a 4°C. Após a retirada do sobrenadante, as amostras marcadas permaneceram a 37°C por alguns minutos para secagem do sedimento sendo adicionados 44 μL de TE *Buffer, 1x, Molecular Grade* (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5-8,0) (Promega). O material foi mantido em banho-Maria a 37°C por 5 min para completa eluição do sedimento.

O procedimento de hibridação consistiu na adição de 11 μL de 10X *Blocking Agent* e 55 μL de *Hi-RPM Hybridization Buffer*. A reação foi incubada a 95°C por 3 min e 37°C por 30 min. Um volume de 100 μL de

cada amostra foi aplicado à lâmina 4x180K, a qual foi acondicionada a 65°C por aproximadamente 20 horas.

A lavagem das lâminas consistiu em banhos consecutivos das soluções presentes no kit do fornecedor incluindo *Wash Buffer 1* por 5 min, *Wash Buffer 2* por 1 min, Acetonitrila por 30 seg e Solução de Estabilização e Secagem por 30 seg .

### ***Análise dos dados de CGH array***

As lâminas foram digitalizadas utilizando o *Agilent DNA Scanner* com o *Software Scan Control 8.1* e os dados foram extraídos pelo *Software Feature Extraction 10.1.1.1* (Agilent Technologies). Os dados foram analisados no *Software DNA Analytics, versão Genomic Workbench 5.0* (Agilent Technologies), o qual permite a identificação de regiões genômicas envolvidas em alterações estruturais, como perdas e ganhos. Essas alterações foram geradas utilizando o banco de dados Hg18 (NCBI Build 36, March 2006). O algoritmo estatístico utilizado foi ADM-2 (do inglês, *Aberration Detection Method 2*). Além disso, foram utilizadas as correções *Centralization* e *Fuzzy Zero*, os quais são usados para remover pequenas variações nas razões de  $\log_2$ . Essas correções fornecem informações sobre a qualidade de cada sonda analisada. Para este estudo, foi criado um filtro específico como parâmetro para detecção inicial de alterações genômicas: *log ratio error* de 0,3, limiar de sensibilidade de 6,7 e presença de no mínimo 3 sondas consecutivas com valores  $-0,3 \leq \log_2 \leq 0,3$  para considerar um determinado segmento como possível região de perda ou ganho.

As regiões identificadas como alteradas foram automaticamente comparadas com o banco de dados *Database of Genomic Variants* (DGV - <http://projects.tcag.ca/variation/>) e submetidas a duas análises. Na primeira, foram consideradas todas as CNVs geradas pelo software *DNA Analytics*. Nessa análise, foi realizada uma comparação entre as CNVs envolvidas em ganhos e perdas genômicas identificadas nos grupos 1 e 2. Em seguida, essas alterações foram comparadas com as CNVs observadas no grupo de referência, composto por 100 mulheres saudáveis da população brasileira (KREPISCHI et al. 2012a). As CNVs comuns, presentes em mais de 1% da população de referência e no DGV, foram consideradas como comuns e excluídas das análises posteriores. Foram consideradas como relevantes para o estudo apenas as CNVs raras, identificadas em 1% da população de referência, e as CNVs novas raras, ausentes tanto na população de referência como no banco de dados DGV. Porém apenas os genes envolvidos nas CNVs novas raras foram categorizados de acordo com as suas funções (Tabela 7). Estas foram obtidas com o auxílio do software *The Expression Analysis Systematic Explorer*, versão 2.0 (EASE).

Os gráficos ilustrando as regiões de ganhos e perdas genômicas identificadas nos grupos 1, 2 e 3 foram realizadas no *Software Graphpad Prism 5* (Graphpad Software Inc.).

**Tabela 7** - Categorização dos genes envolvidos em CNVs novas raras por CGH *array* quanto às classes funcionais.

<b>1. Estrutura celular, motilidade e transporte</b>
Transporte
Organização e estrutura intracelular
Matriz extracelular, membrana e citoesqueleto
Biogênese e organogênese citoplasmática
Motilidade
<b>2. Metabolismo celular</b>
Metabolismo de proteínas
Metabolismo de DNA
Metabolismo de RNA
Metabolismo de lipídeos
Metabolismo de carboidratos
Metabolismo geral
Regulação da transcrição
<b>3. Crescimento, desenvolvimento e manutenção celular</b>
Homeostasia
Diferenciação celular e tecidual
Ciclo celular
Morte celular
<b>4. Comunicação celular</b>
Transdução de sinal
Resposta a estímulo externo
Adesão celular
Sinalização celular a célula
Reconhecimento celular
<b>5. Função desconhecida</b>

### 3.2.4 PCR quantitativa em Tempo Real (qPCR)

O gene *ROBO1* foi avaliado por qPCR para confirmar os resultados obtidos na análise dos dados de aCGH.

Os iniciadores utilizados para a detecção do gene alvo *ROBO1* foram desenhados a partir da sequência de DNA do gene em questão

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, <http://genome.ucsc.edu/>) pelo programa Primer-Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). O programa Oligoanalyzer (<http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer>) foi utilizado para prever possíveis formações de estruturas secundárias (*hairpins*) e dímeros de iniciadores (homo e heterodímeros), que podem levar a redução da eficiência da reação. As sequências dos iniciadores para o gene alvo (tanto para a reação de validação como de mapeamento da alteração) e referência estão descritos na Tabela 6.

Para a confirmação de perdas detectadas para sondas específicas no experimento de aCGH, foram desenhados dois pares de iniciadores. O iniciador 1 (P1), mapeado na região do íntron 4 e 5 do gene *ROBO1*, flanqueia a sonda S21 (A\_16\_P16292303), uma das quatro sondas alteradas envolvidas na perda identificada nesse gene. O iniciador 2 (P2), mapeado na região do éxon 4, flanqueia a sonda S26 (A\_14\_P133797), mapeada no éxon mais próximo da alteração identificada pela metodologia de CGH *array* (Tabela 8, Figura 2). Para esta análise, foram utilizadas DNA de duas pacientes (grupo 1: SM56 e grupo 2: SM37) que apresentaram a deleção, e de quatro familiares da paciente SM37 (SM37.2, SM37.3, SM37.4 e SM37.5).

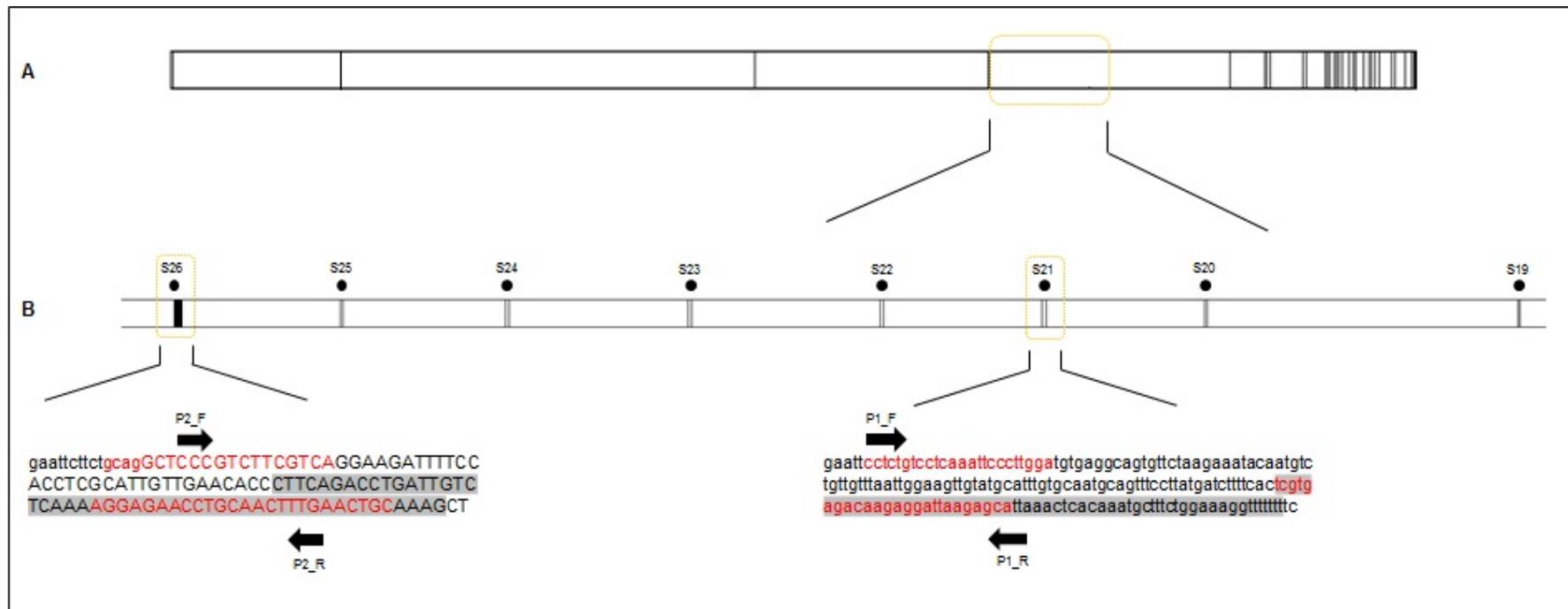
Com o objetivo de mapear a extensão da perda genômica identificada no gene *ROBO1* por CGH *array* foram desenhados seis pares de iniciadores (P1 ao P6) flanqueando regiões intrônicas (anterior e posterior ao éxon 4), exônica e da região de *splicing* alternativo (Tabela 8, Figura 3). Para esta análise, foram avaliadas amostras de duas pacientes (grupo 1: SM56 e

grupo 2: SM37) que apresentaram a mesma deleção por aCGH, e de seis familiares, sendo dois da paciente SM56 (SM56.2 e SM56.3) e quatro da SM37 (SM37.2, SM37.3, SM37.4 e SM37.5).

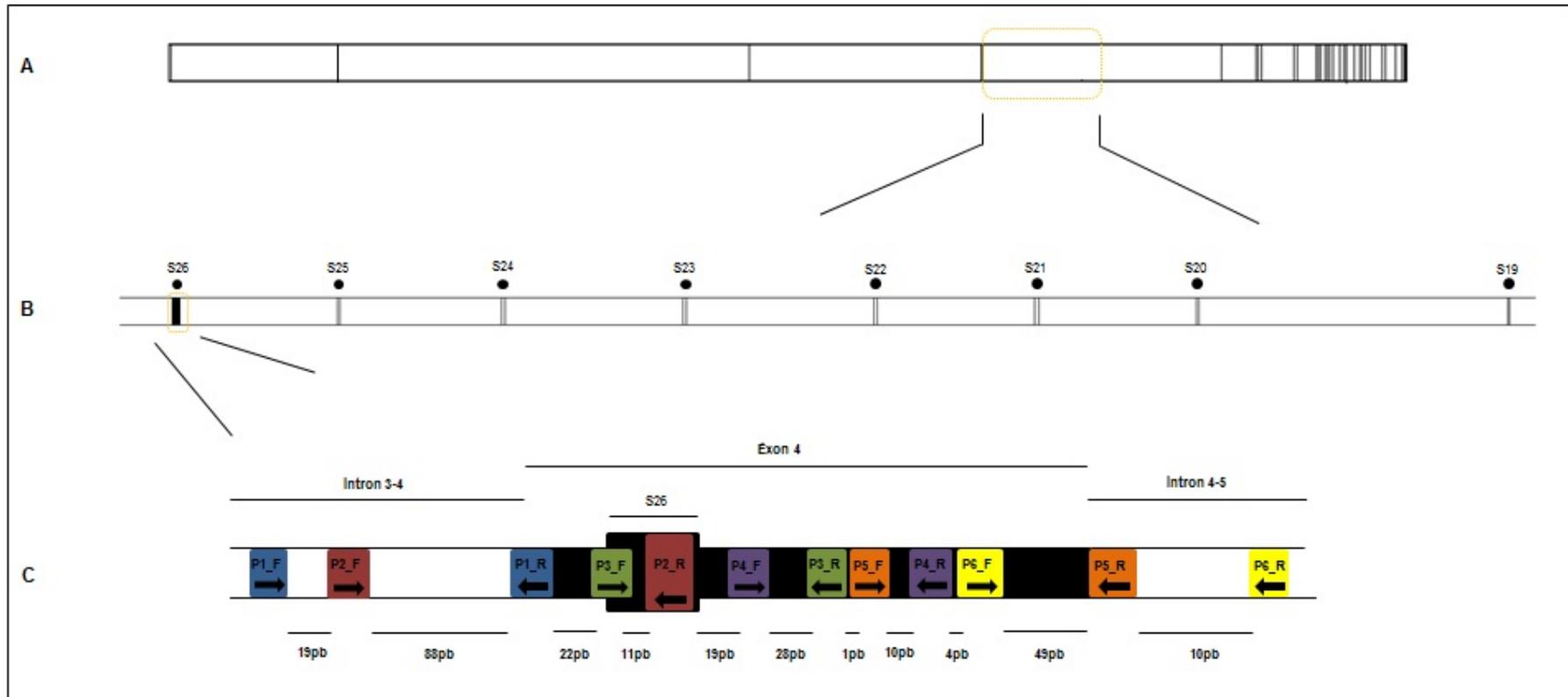
**Tabela 8** - Iniciadores utilizados nas amplificações pela PCR.

Gene	Chr	Seqüências	Tamanho do Amplicon
<b>ROBO1</b>			
<b>Reação de Validação</b>			
3 (P1) (I4-5)		F: 5' CCTCTGTCCTCAAATTCCTTGGG 3' R: 5' TGCTCTTAATCCTCTTGTCTCACGA 3'	140 pb
3 (P2) (E4)		F: 5' GCAGGCTCCCGTCTTCGTCA 3' R: 5' GCAGTTCAAAGTTGCAGGTTCTCCT 3'	99 pb
<b>Mapeamento da alteração</b>			
3 (P1) (E4)		F: 5' GGTGTAGTCAAGGCGGACAC 3' R: 5' TGACGAAGACGGGAGCCTGC 3'	179 pb
3 (P2) (E4)		F: 5' GCTAGGCCAATGTTATGCAGTG 3' R: 5' GCAGTTCAAAGTTGCAGGTTCTCCT 3'	209 pb
3 (P3) (E4)		F: 5' GTTGAACACCCTTCAGACCTG 3' R: 5' GGTGTGAGCGAGGGTTCATCT 3'	145 pb
3 (P4) (E4)		F: 5' CACCCACTATTGAATGGTACA 3' R: 5' CCGTCCATGTACTATACGTAAG 3'	122 pb
3 (P5) (E4)		F: 5' AATGTTGCTGCCGAGTGGAT 3' R: 5' GCGCCCAGTTTACTTACTGGCTAC 3'	160 pb
3 (P6) (E4)		F: 5' AAGGAGTCTATGTCTGTGTAGCAAGG 3' R: 5' GATCAAACAATGACGCCACTCTG 3'	118 pb
<b>GAPDH*</b>			
12 (I2-3)		F: 5' GCAACCGGGAAGGAAATGA 3' R: 5' CAGGAGCGCAGGGTTAGTCA 3'	88 pb
<b>HPRT*</b>			
X (E3)		F: 5' GAACGTCTTGCTCGAGATGTGA 3' R: 5' TCCAGCAGGTCAGCAAAGAAT 3'	110 pb

**Legenda:** \* Genes endógenos; E: éxon; I: íntron; F: iniciador *forward*; R: iniciador *reverse*; P: par d



**Figura 2** - Representação gráfica dos iniciadores utilizados na qPCR para confirmação da perda de seqüências do gene *ROBO1*. **A.** O *ROBO1* apresenta 31 éxons. O retângulo em laranja representa a perda genômica identificada no íntron 4-5, detectada por aCGH, e o éxon mais próximo dessa alteração. **B.** Esquema das oito sondas mapeadas nessa região (S19 a S26). A região das sondas destacadas pelo retângulo foram selecionadas para validação no experimento de qPCR. As letras em vermelho representam as seqüências dos iniciadores e em cinza, as seqüências das sondas. P1\_F e P1\_R: par de iniciador 1 *forward* e *reverse*, respectivamente; P2\_F e P2\_R: par de iniciador 2 *forward* e *reverse*, respectivamente; S: sonda.



**Figura 3** - Representação gráfica dos iniciadores utilizados na qPCR para o mapeamento da deleção do gene *ROBO1*. **A.** Estão indicados os introns 3-4, exon 4 e intron 4-5 do *ROBO1*. O retângulo em laranja representa a perda genômica identificada no intron 4-5 e o éxon mais próximo dessa alteração. **B.** Esquema das oito sondas mapeadas nessa região (S19 a S26) presentes na plataforma de aCGH. **C.** Esquema dos introns anterior e posterior ao éxon 4 e a localização dos seis pares de iniciadores construídos para o mapeamento da deleção identificada no intron 4-5. P\*\_F e P\*\_R: par de iniciador *forward* e *reverse*, respectivamente; \* representa o número do iniciador (1 a 6); S: sonda.

O gene de referência, *GAPDH*, é frequentemente utilizado como gene de referência em análises de qPCR e neste estudo foi também selecionado por ter sido utilizado em estudo prévio de dosagem gênica em amostras obtidas a partir de sangue periférico (Reis et al. 2002). O gene *HPRT* foi selecionado por estar mapeado em Xq26.1. Dessa maneira, mulheres apresentam duas cópias do gene, enquanto homens apresentam uma única cópia.

A eficiência da reação de amplificação para cada par de iniciadores foi determinada por meio de uma curva de diluição de um *pool* de DNA de amostras de sangue periférico em concentrações seriadas (100 ng, 10 ng, 1 ng, 0,1 ng e 0,01 ng). Para maior precisão, as reações em duplicata foram montadas no pipetador automático QIAgility (Qiagen, Courtaboeuf, France). Na reação foram utilizados 10 ng de DNA, 10  $\mu$ M de cada iniciador e 5  $\mu$ L de *Power<sup>®</sup> SYBR<sup>®</sup> Green* (Applied Biosystems, Foster City, CA) num volume final de 12,0  $\mu$ L. Foram utilizadas as seguintes condições de reação: desnaturação a 95°C por 10 min, seguido de 40 ciclos a 95°C por 15 seg e 60°C por 1 min no ABI Prism 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Para a avaliação de todos os genes foram incluídos NTCs (*no template control*). Em todas as reações foram incluídos DNA obtidos a partir do sangue periférico de controles de mulheres e homens saudáveis, sem história pessoal e familiar de câncer, os quais foram utilizados como normalizadoras da reação.

### **Análise dos dados de qPCR**

Os valores de Cq (ciclo de quantificação) para cada diluição do DNA e as concentrações dos mesmos (log<sub>10</sub> DNA) foram utilizados para a construção da curva padrão. A partir desta curva foi calculada a equação da reta e o valor da sua inclinação ou *slope*. O cálculo da eficiência da amplificação foi obtido pela fórmula  $E=10^{(-1/slope)} - 1$ . Os ensaios demonstraram eficiências próximas a 100%, indicando que ao final de cada ciclo o transcrito molde estava duplicado. Em alguns casos houve uma variação de cerca de 10%, porém isso não interferiu significativamente nos resultados obtidos. Os picos das curvas de dissociação foram avaliados para verificar a especificidade do produto amplificado.

O intervalo do número de cópias do gene *ROBO1* foi avaliado pelo método  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  (Livak e Schmittgen, 2001).

$$2^{-\Delta\Delta Cq} = 2^{-[\Delta Cq (\text{alvo}) - \Delta Cq (\text{referência})]}$$

Para o cálculo do  $\Delta Cq$  (alvo) foi realizada a subtração da média do Cq das duplicatas do gene alvo no grupo amostral e no grupo controle e para o cálculo do  $\Delta Cq$  (referência) foi realizada a subtração da média do Cq das duplicatas do gene referência no grupo amostral e no grupo controle.

#### **3.2.5 Imunoistoquímica (IHQ)**

A expressão da proteína ROBO1 foi avaliada por imunoistoquímica. Esta proteína foi selecionada a partir dos resultados obtidos na análise por CGH *array*. A metodologia foi aplicada em lâminas obtidas de um bloco de parafina de um único caso tumoral (SM37) e de microarranjos de tecido

(*tissue microarray* - TMA), contendo amostras independentes de carcinomas mamários (313 casos) e colorretais (279 casos), selecionados a partir do arquivo do Hospital A.C. Camargo.

As lâminas contendo os cortes em parafina foram submetidas a tratamento com xilol para a retirada da parafina e, em seguida, hidratadas em soluções com concentrações decrescentes de etanol. A recuperação antigênica foi realizada segundo a padronização do anticorpo selecionado. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito com solução de peróxido de hidrogênio a 3% com três trocas. Após o bloqueio da peroxidase, foi realizado o bloqueio da avidina/biotina (DAKO<sup>®</sup> Biotin Blocking System) e proteína (DAKO<sup>®</sup> Protein Block Serum-Free). As reações de imunistoquímica foram realizadas utilizando anticorpos primários anti-ROBO1 (ab7279, Abcam Inc, Cambridge, MA) de acordo com as instruções do fabricante. Após 30 min de incubação, as lâminas foram lavadas em PBS (tampão salino fosfato) e incubadas por 30 min com o anticorpo secundário. Em seguida, as mesmas foram incubadas por 30 min utilizando o sistema de detecção de polímeros (Advanced TM HRP Link, Dako Cytomation, K0690, Denmark). As reações foram realizadas a partir de soluções contendo 0,6 mg/mL de 3.3'-diaminobenzina tetrahidrocloro (DAB, Sigma, St Louis, MO) e 0,01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. As lâminas foram coradas com hematoxilina de Mayer (Allkimia<sup>®</sup>), desidratadas e montadas com lamínula. As reações foram acompanhadas de um controle positivo e dois controles negativos. O controle positivo foi representado por um carcinoma de pulmão sabidamente positivo para o anticorpo testado. E o primeiro controle negativo foi feito pela

não utilização do anticorpo primário e o segundo pela retirada do anticorpo secundário durante a reação.

### ***Análise dos dados de IHQ***

Para os TMAs de mama e colorretal foram realizadas duas análises envolvendo diferentes grupos de pacientes. Na primeira, foram utilizados os casos com história familiar de câncer e, na segunda, foram utilizados os pacientes que preenchem os critérios de mama-cólon (SMC), previamente descritos no item 3.1 desta seção. Dessa maneira, foram selecionados os casos com diagnóstico de câncer de mama (TMA de mama) e parente com CCR e os casos com diagnóstico de CCR (TMA colorretal) e parentes com câncer de mama.

Assim, no TMA de mama, foram realizadas duas análises: (1) pacientes com história familiar de câncer e (2) casos com parentes com diagnóstico de CCR. E no TMA colorretal, foram realizadas três análises: (1) pacientes com história familiar de câncer que preenchem os critérios de Amsterdam (Anexo 2); (2) pacientes com história familiar de câncer que preenchem os critérios de Bethesda (Anexo 3) e (3) casos com parentes com diagnóstico de câncer de mama.

O anticorpo policlonal de coelho ROBO1 (ab7279, Abcam Inc, Cambridge, MA; dilution 1:400), reconhece o domínio citoplasmático da proteína ROBO1. O padrão de marcação detectado na maioria dos tecidos normais é citoplasmática moderada, acompanhada por coloração nuclear em alguns tecidos. As células tumorais também apresentam marcação

citoplasmática moderada, porém em muitos casos há marcação nuclear. Enquanto as glândulas mamárias normais apresentam imunomarcação intensa, as tumorais apresentam marcação moderada ou fraca, além de marcação nuclear. No tecido colorretal normal e tumoral observa-se imunocoloração moderada, porém o tumoral apresenta marcação nuclear (<http://www.proteinatlas.org/>). O escore de intensidade e extensão foi realizado visualmente pela estimativa da porcentagem de coloração positiva presente no citoplasma e membrana nuclear das células neoplásicas.

A análise foi realizada de acordo com a intensidade (0: marcação ausente; 1: fraca; 2: moderada; 3: marcação forte) e extensão da marcação nas células neoplásicas (1: 1/3; 2: 1/3 a 2/3; 3: acima de 2/3 da área total do corte).

Os testes estatísticos utilizados foram Exato de Fisher e Qui-Quadrado de Pearson, sendo que foram considerados resultados estatisticamente significativos aqueles com  $P < 0,05$ .

### **3.2.6 Análise Citogenética Clássica**

A análise cromossômica foi realizada em sete indivíduos da família SM89. Para a cultura dos linfócitos, foram coletados 5 mL de sangue periférico de cada indivíduo com o anti-coagulante heparina. Os linfócitos foram cultivados em meio RPMI (GIBCO) acrescido de 10% de Soro Bovino Fetal (Hyclone), 50 µg/mL de penicilina, estraptavidina (0,5%) e fitohemaglutinina (SIGMA). A cultura das células foi realizada segundo a metodologia descrita por Moorhead et al. (1960). Após 71 horas, as culturas

foram submetidas a tratamento com colchicina 0,0016% por 1 hora. Em seguida, a preparação foi submetida a tratamento com solução hipotônica KCl 0,075M seguido de fixação com metanol:ácido acético (3:1) por três vezes.

As lâminas contendo as preparações cromossômicas foram submetidas ao bandamento DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)-reverso (padrão de bandas semelhante ao bandamento GTG). A técnica usada consiste na imersão das lâminas contendo as preparações celulares em solução seriada de etanol (70%, 90%, 100%) por 3 min cada. Após a secagem, as lâminas foram tratadas em solução de pepsina 10% a 37°C por 10 min. Em seguida, foram incubadas em solução 2xSSC a 37°C por 10 min e lavadas novamente em solução seriada de etanol. Após a secagem, as lâminas foram colocadas rapidamente em solução de formamida a 71°C e lavadas em solução seriada de etanol. Após a secagem, foi adicionado 8 µL de DAPI nas regiões com maior número de metáfases. Em seguida, as lâminas foram mantidas a -20C por 24h antes da análise cromossômica.

A análise citogenética foi realizada a partir da montagem e elaboração das fórmulas cariotípicas segundo recomendações do ISCN (2009). Um total de 40 metáfases por caso (SM89, SM89.2, SM89.3, SM89.4, SM89.5, SM89.6, SM89.7) foram analisadas no microscópio Olympus BX61 conectado a um sistema de análise de imagens, *Software BandView 4.5* (Applied Spectral Imaging, Israel).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 SEQUENCIAMENTO

#### 4.1.1 Genes *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53* e *CHEK2*

A proposta deste estudo foi avaliar alterações genômicas por aCGH num grupo de pacientes sem mutações patogênicas nos genes *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53* e *CHEK2* avaliadas em um estudo anterior (coordenado pelo Dr Benedito M Rossi e Dra Dirce M Carraro). Entretanto, no decorrer do presente projeto alguns casos que estavam em análise dos dados de sequenciamento foram confirmados como contendo tais mutações e já haviam sido analisados por aCGH. Por esta razão, foram incluídos neste estudo.

Entre esses casos, foram identificados três com mutações patogênicas no gene *BRCA1* incluindo: SM89 (Grupo 1), SM50 e SM102 (ambos do Grupo 2). No gene *BRCA2*, foi detectada mutação patológica apenas no caso SM86 (Grupo 1) (Tabela 9). Estes casos não apresentaram mutações nos genes *TP53* e *CHEK2*.

**Tabela 9** - Mutações patogênicas no gene *BRCA1* e *BRCA2* identificadas em quatro pacientes.

Casos	Grupo	CNVs	Mutação	
			Éxon	Nomenclatura
<b><i>BRCA1</i></b>				
SM50	2	3	15	c.4794+1G>A
SM89	1	5	11	c.4406C>A, p.Y1429X
SM102	2	1	23	c.5582_5583insT, p.H1822Sfs*8
<b><i>BRCA2</i></b>				
SM86	1	4	18	c.8423T>G, p.L2732*

#### 4.1.2 Genes *MLH1* e *MSH2*

Onze pacientes apresentaram mutações, envolvendo os genes *MLH1* e *MSH2*. Entre as 10 mutações identificadas, apenas uma, no gene *MLH1*, foi classificada como possivelmente patogênica. As demais foram consideradas não patogênicas (Tabela 10).

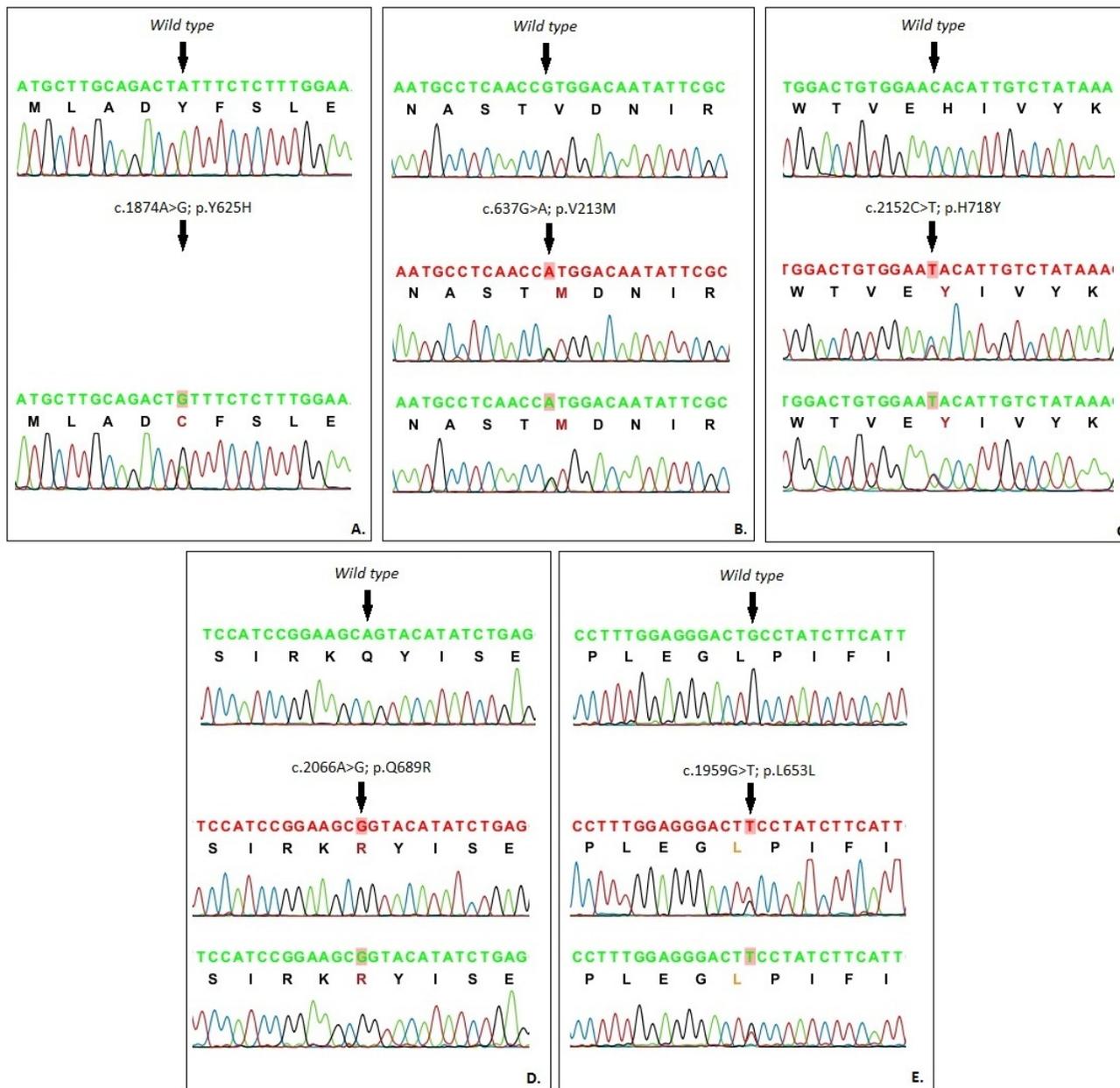
A mutação classificada como possivelmente patogênica identificada no caso SM41 é do tipo *missense*, e está localizada no éxon 16, na posição 1874, envolvendo a troca da base adenina por guanina. Essa alteração promove a troca do aminoácido tirosina por histidina (Tabela 10, Figura 4).

Entre as mutações classificadas como não patogênicas cinco foram identificadas como *missense* (três no *MLH1* e duas no *MSH2*) e quatro silenciosas (uma no *MLH1* e três no *MSH2*) (Tabela 10, Figuras 4 e 5). Três casos (SM28, SM173 e SM154) apresentaram a mesma mutação não patogênica do tipo *missense* c.965G>A, p.G322D.

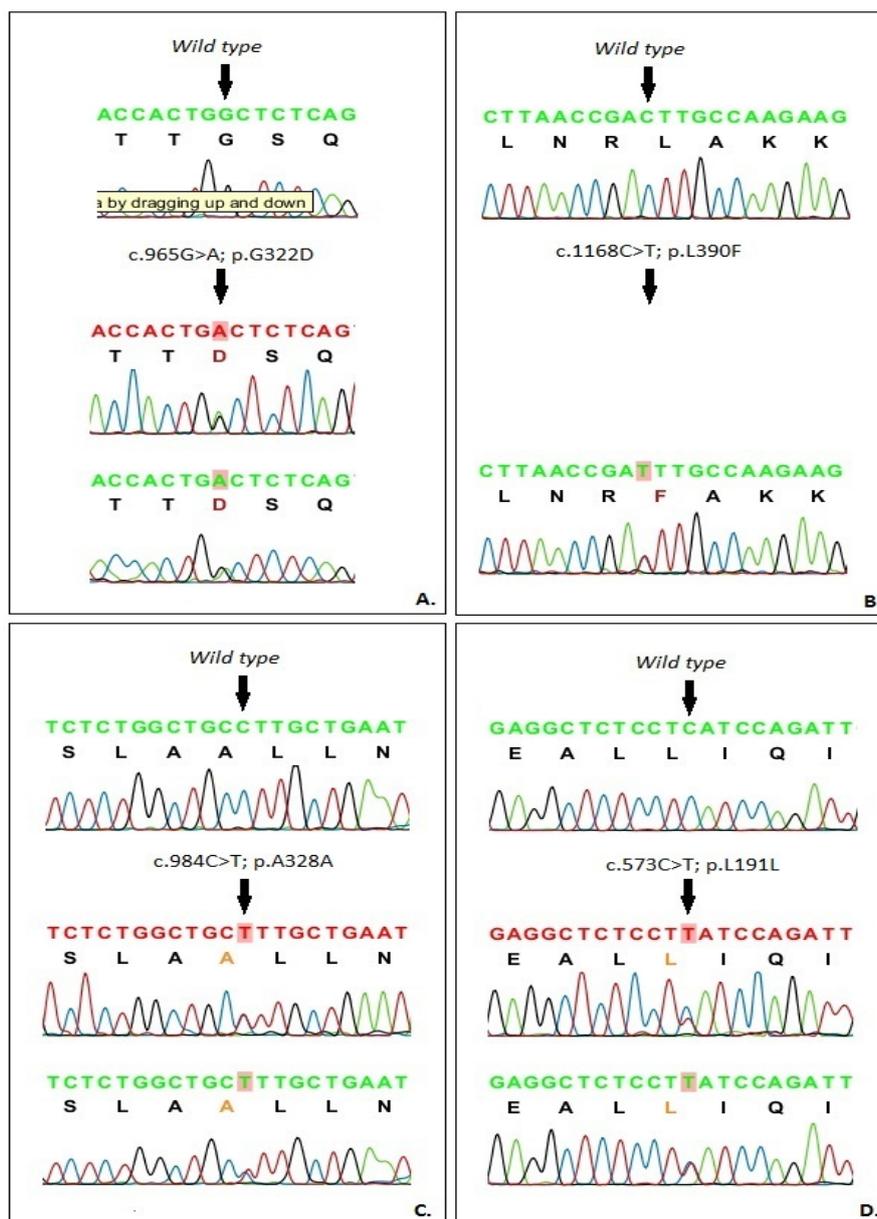
**Tabela 10** - Mutações não patogênicas previamente descritas no LOVD e *MMR Gene Unclassified Variants Database*, identificadas em nove pacientes.

Casos	Total de CNVs	Alteração	Éxon	Tipo	Classificação
<b><i>MLH1</i></b>					
SM41	12	c.1874A>G, p.Y625H	16	<i>Missense</i>	Possivelmente patogênica
SM91	0	c.637G>A, p.V213M	8	<i>Missense</i>	Não patogênica
SM98	18	c.1959G>T, p.L653L	17	Silenciosa	Não patogênica
SL55	4	c.2066A>G, p.Q689R	18	<i>Missense</i>	Não patogênica
SM100	13	c.2152C>T, p.H718Y	19	<i>Missense</i>	Não patogênica
SL36	8	c.2027T>C, p.L67P	18	<i>Missense</i>	Patogênica
<b><i>MSH2</i></b>					
SM60	5	c.573C>T, p.L191L	3	Silenciosa	Não patogênica
SM28,	10				
SM173,	7	c.965G>A, p.G322D	6	<i>Missense</i>	Não patogênica
SL154	8				
SM91	0	c.984C>T, p.A328A	6	Silenciosa	Não patogênica
SM67	4	c.1168 C>T; p.L390F	7	<i>Missense</i>	Não patogênica
SM92	6	c.1666T>C, p.L556L	11	Silenciosa	Não patogênica

A comparação entre o número de CNVs entre os casos com e sem mutações patogênicas não foi diferente entre os casos analisados. O maior número de CNVs foi detectado na paciente SM98 (18 CNVs), que apresentou mutação silenciosa não patogênica; em seguida foi a paciente SM100 (13 CNVs) que apresentou mutação *missense* não patogênica. A paciente SM41 (12 CNVs) apresentou uma mutação *missense* possivelmente patogênica. Os outros pacientes com mutação não patogênica apresentaram número inferior ou igual a 10 CNVs.



**Figura 4** – Representação gráfica das mutações identificadas no gene *MLH1*. **A.** SM41: mutação *missense* e patogênica. **B.** SM91: mutação *missense* e não patogênica. **C.** SM100: mutação *missense* e não patogênica. **D.** SL55: mutação *missense* e não patogênica. **E.** SM98: mutação silenciosa e não patogênica.



**Figura 5** - Representação gráfica das mutações identificadas no gene *MSH2*. **A.** SM28, SM173, SL154: mutação *missense* e não patogênica. **B.** SM67: mutação *missense* e não patogênica. **C.** SM91: mutação silenciosa e não patogênica. **D.** SM60: mutação silenciosa e não patogênica.

## 4.2 CGH ARRAY

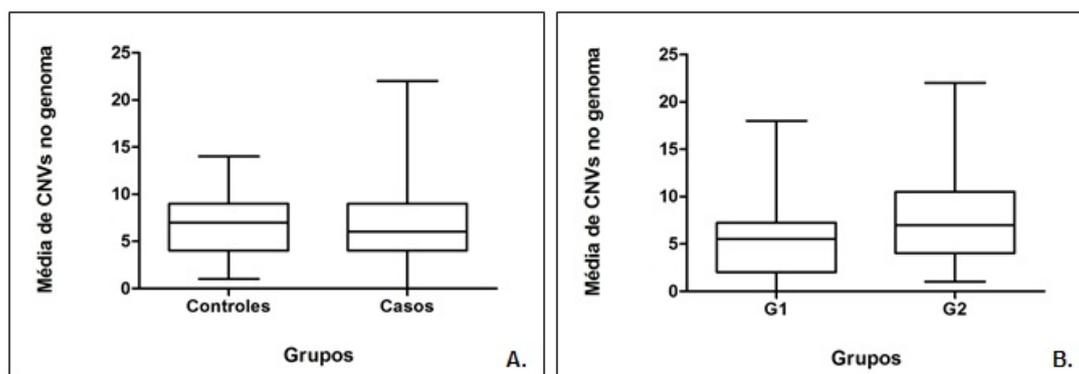
### 4.2.1 Casos sem mutação nos genes *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *CHEK2*, *MLH1*, *MSH2*

No total foram identificadas 418 alterações genômicas no grupo amostral, composto por 59 pacientes (média: 7,08 CNVs/indivíduo, desvio padrão (dp): 4,95 CNVs/indivíduo) e 706 no grupo controle, composto por 100 mulheres brasileiras e saudáveis (média: 7,06 CNVs/indivíduo, dp: 3,18 CNVs/indivíduo). Os dados da população de mulheres brasileiras saudáveis faz parte de um projeto aprovado pela FAPESP/CNPq – INCT de Oncogenômica (Processo Nº: 573589/2008-9). Estes achados foram recentemente publicados (KREPISCHI et al. 2012a) e foram utilizados para a comparação com os dados do presente estudo.

O grupo 1, formado por 26 pacientes que tinham câncer de mama ou colorretal, apresentou 161 alterações, envolvendo 76 regiões cromossômicas, com média de 6,19 CNVs por indivíduo (dp: 5,0 CNVs/indivíduo). O grupo 2, composto por 33 pacientes com câncer de mama e colorretal, apresentou 257 alterações, envolvendo 99 regiões, com média de 7,79 CNVs por indivíduo (dp: 7,0 CNVs/indivíduo).

A comparação do número de CNVs entre os 59 casos e os 100 casos de referência não revelou diferença significativa ( $P= 0,3882$ ; Figura 6A). Quando comparados individualmente com o grupo controle, os grupos 1 e 2 também não apresentaram diferença significativa ( $P= 0,0983$  e  $P= 0,8690$ , respectivamente). Os casos que compõem o grupo 2 apresentaram um

número maior de CNVs, quando comparado com o grupo 1, entretanto, essa diferença também não foi significativa ( $P= 0,1634$ ; Figura 6B). O grupo 2 também apresentou um número maior de CNVs quando comparado com o grupo de referência, porém esse aumento não foi significativo ( $P= 0,8690$ ; Teste de Mann-Whitney).



**Figura 6** - Frequência de CNVs no grupo controle e amostral. **A.** Não foi verificada diferença significativa no número de CNVs entre o grupo amostral e de referência ( $P= 0,3882$ ; Teste de Mann-Whitney). **B.** O grupo 2 apresentou um aumento no número de CNVs quando comparado com o grupo 1, porém não foi significativo ( $P= 0,1634$ ; Teste de Mann-Whitney).

Dentre as alterações observadas no **Grupo 1**, 78 (48,45%) regiões estavam envolvidas em ganhos genômicos e 83 (51,55%) em perdas genômicas (Figura 7A). A diferença observada entre o número de ganhos e perdas genômicas não foi significativa ( $P= 0,4060$ ). O tamanho das regiões de ganho variaram entre 15,7 Kb a 1,6 Mb (15.788 a 1.694.601 pb), envolvendo o total de 147 genes e 2 microRNAs, enquanto as perdas variaram de 21,0 Kb a 2,0 Mb (21.014 a 2.039.082 pb), englobando 96 genes e 3 microRNAs. A diferença entre o tamanho das regiões alteradas envolvidas em ganhos e perdas genômicas não foi estatisticamente significativa ( $P= 0,3986$ ) (Figura 7B).

Segundo os filtros adotados neste experimento, dois casos do grupo 1 não apresentaram CNVs (SM91 e SM165) e três casos, SM26 (17 CNVs), SM98 (18 CNVs) e VCS (18 CNVs), apresentaram mais de 10 alterações (Figura 7C).

Aproximadamente 15% das CNVs identificadas no grupo 1 estão mapeadas no cromossomo 1 (24/161). Nos cromossomos 2, 3, 6, 8, 14, 15 e 22 foram observadas de 5 a 10% das CNVs. Os demais cromossomos (4, 5, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 16, 17, 18, 19, 20, 21, X) apresentaram menos de 5% das CNVs identificadas (Figura 7D).

Dentre as alterações observadas no **Grupo 2**, 119 (46,30%) regiões estavam envolvidas em ganhos e 138 (53,70%) em perdas genômicas (Figura 7A). A diferença observada entre o número de ganhos e perdas genômicas não foi significativa ( $P= 0,3679$ ). O tamanho das regiões de ganhos variaram entre 15,7 Kb a 96,5 Mb (15.788 a 96.494.907 pb), envolvendo o total de 571 genes e 23 microRNAs, enquanto as perdas variaram de 19,4 Kb a 5,6 Mb (19.463 a 5.670.203 pb), englobando 118 genes e 2 microRNAs. A diferença entre o tamanho das regiões alteradas envolvidas em ganhos e perdas genômicas foi estatisticamente significativa ( $P= 0,0056$ ) (Figura 7B).

Todos os casos do grupo 2 apresentaram pelo menos uma alteração, sendo que 8/33 apresentaram mais de 10 CNVs (SM7: 12, SM12: 11, SM37: 11, SM47: 19, SM64: 13, SM87: 22, SM88: 16, SM100: 13) (Figura 7C).

Aproximadamente 13% das CNVs identificadas entre as amostras do grupo 2 estão mapeadas no cromossomo 1 (33/257). Os cromossomos 19 e

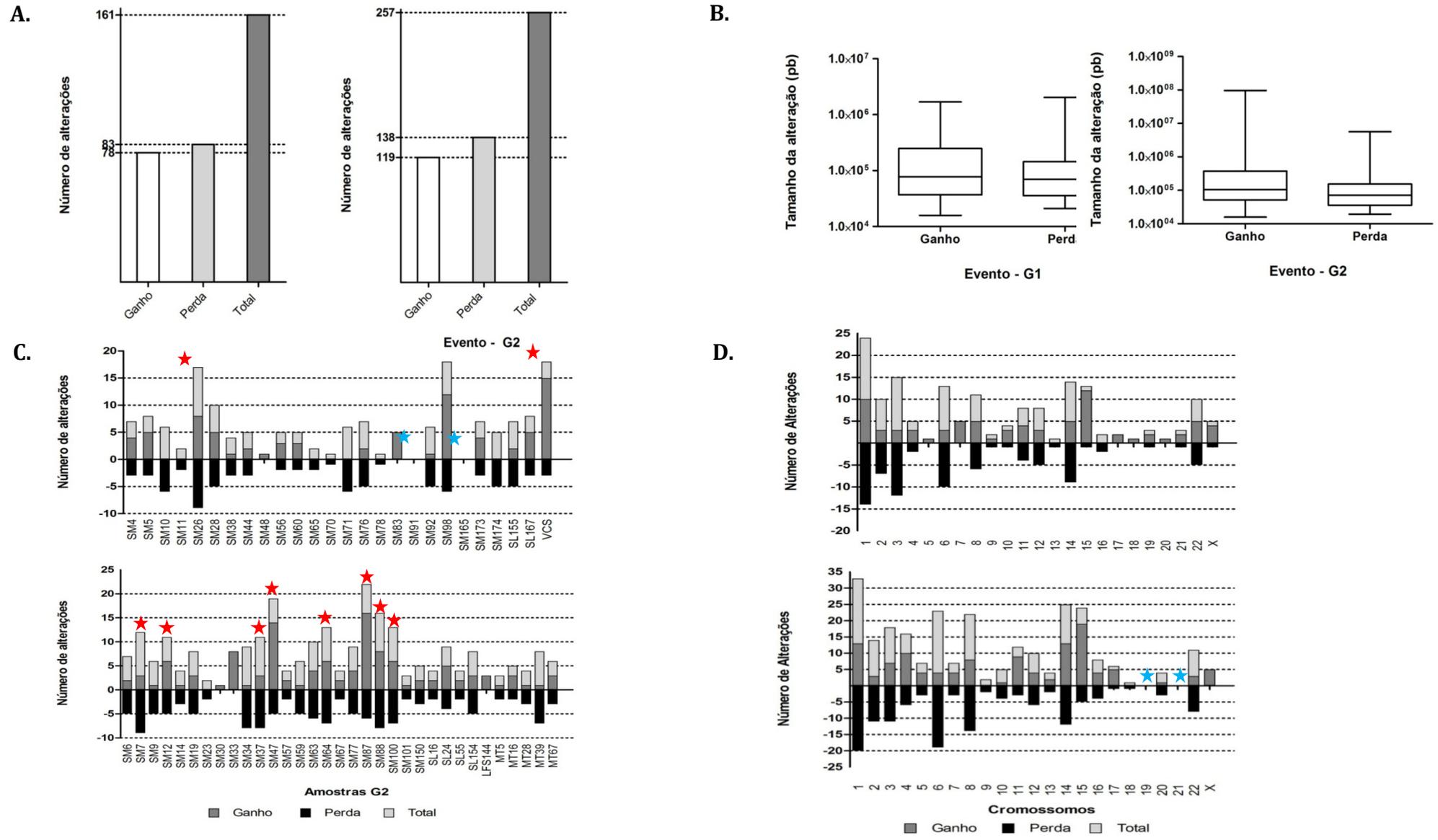
21 não apresentaram CNVs. Por outro lado, nos cromossomos 2, 3, 4, 6, 8, 14 e 15 foram observadas de 5 a 10% das alterações. Os demais cromossomos (5, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 16, 17, 18, 20, 22 e X) apresentaram menos de 5% das CNVs identificadas (Figura 7D).

Os ganhos genômicos do grupo 2 (15,7 Kb a 96,5 Mb) foram maiores que as do grupo 1 (15,7 Kb a 1,6 Mb), porém essa diferença não foi estatisticamente significativa ( $P= 0,1968$ , Teste de Mann-Whitney). O mesmo foi observado entre as perdas genômicas. O grupo 2 apresentou regiões genômicas envolvidas em perdas maiores (19,4 Kb a 5,6 Mb) que o grupo 1 (21,0 Kb a 2,0 Mb), porém não foi significativo ( $P= 0,9983$ , Teste de Mann-Whitney).

No grupo de referência observou-se uma variação de tamanho entre 13,8 Kb a 2,0 Mb para ganho e uma variação entre 9,7 Kb a 6,0 Mb para perda genômica. O tamanho das alterações genômicas do grupo de referência foi comparado com o tamanho das CNVs identificadas no grupo amostral.

Não foi observada diferença significativa entre os tamanhos das regiões genômicas envolvidas em ganhos dos grupos 1 e 2 quando comparados com o grupo de referência (Grupo 1:  $P= 0,2973$  e Grupo 2:  $P= 0,4249$ ; Teste de Mann-Whitney). Porém, quando comparou-se o tamanho das regiões genômicas envolvidas em perdas nos grupos 1 e 2 com o grupo de referência, observou-se uma diferença marginalmente significativa com o grupo 1 ( $P= 0,0609$ , Teste de Mann-Whitney) e uma diferença significativa com o grupo 2 ( $P= 0,0271$ , Teste de Mann-Whitney).

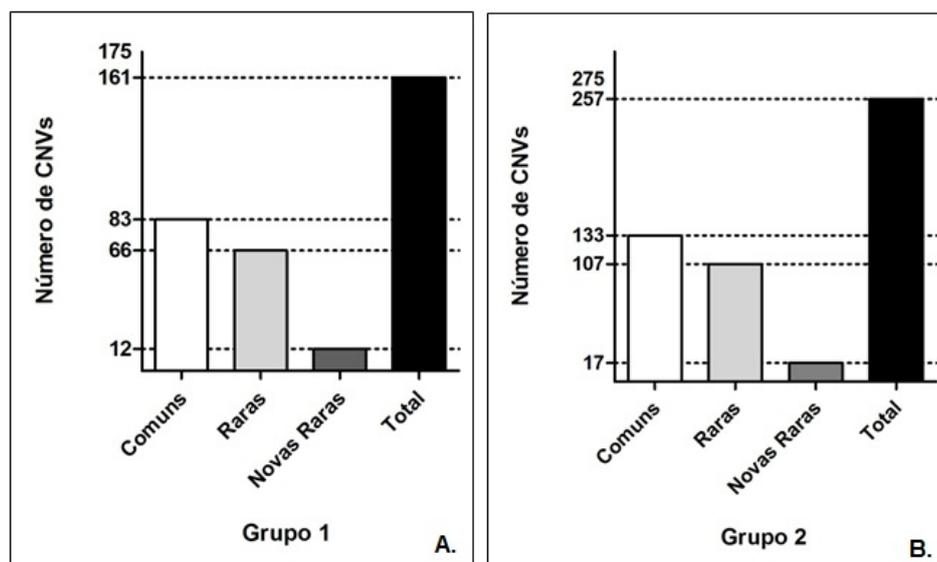
Apenas o hsa-mir-1268, mapeado em 15q11.2, foi identificado como alterado nos dois grupos. Ganhos do hsa-mir-1268 foi detectado em cinco pacientes do Grupo 1 (SM4, SM48, SM92, SM98, VCS) e seis pacientes do Grupo 2 (SM33, SM59, SM87, SM88, SL154 E MT67). Perdas envolvendo o miR1268 foi detectado em um caso (MT39). Entre os pacientes envolvidos em ganho, apenas dois (SL154 e MT67) apresentaram alterações idênticas, de mesmo tamanho (1.609.899 pb). Os pacientes SM92 e VCS (Grupo 1) e SM59 (Grupo 2) apresentaram a mesma alteração, incluindo tamanho (pb) e número de sondas.



**Figura 7** - Representação gráfica das alterações genômicas identificadas no grupo 1 e 2. **A.** Total de alterações envolvendo regiões de ganho e perda. **B.** Tamanho das alterações genômicas envolvidas em ganhos e perdas. **C.** Quantidade de ganhos e perdas identificadas em cada paciente do grupo amostral. Em azul e vermelho representam os casos com zero CNV e mais de 10 CNVs, respectivamente. **D.** Quantidade de ganhos e perdas identificadas em cada cromossomo. Em azul estão representados os cromossomos sem alteração.

Após a comparação das alterações com o grupo controle, as CNVs foram divididas em três classes: **CNVs comuns**, identificadas em mais de 1% do grupo referência (indivíduos saudáveis da população brasileira); **CNVs raras**, identificadas em 1% ou ausentes no grupo controle e as **CNVs novas raras**, ausentes no grupo controle e no banco de dados DGV.

No grupo 1 foram identificadas 83 CNVs comuns, 66 raras e 12 novas raras (Figura 7). No grupo 2, foram verificadas 133 CNVs comuns, 107 raras e 17 novas raras (Figura 8). Não houve diferença significativa quando se comparou os tipos de CNVs entre os dois grupos de casos (grupos 1 e 2).



**Figura 8** - Representação gráfica dos tipos de CNVs (comuns, raras e novas raras) detectadas após a comparação com o grupo controle nos dois grupos de casos. **A.** CNVs observadas no grupo 1. **B.** CNVs verificadas no grupo 2.

Neste estudo foram consideradas como relevantes apenas as CNVs raras e novas raras. No **grupo 1**, 57 das 66 CNVs raras não foram detectadas na população saudável de referência; as demais, estão descritas em 1% dessa população e descritas no DGV. Apenas uma alteração rara,

envolvida em perda genômica, presente em 1% do grupo controle, não está descrita no banco de dados do DGV. Essa alteração, identificada na paciente SM28, tem 30.698 pb, está mapeada em 3p24.3 e engloba o gene *TBC1D5*. Todas as CNVs novas raras estão ausentes no grupo controle e no banco de dados do DGV (Tabela 11).

No **grupo 2**, 84/107 CNVs raras não estão descritas na população controle, e o restante, está descrito em 1% dessa população. Todas as CNVs novas raras estão ausentes no grupo controle e no banco de dados do DGV (Tabela 12).

No grupo 1, oito CNVs foram identificadas em mais de um paciente, sendo sete raras (1p31.1, 4q34.1, 6p11.2, 6p21.33, 15q11.2, 22q11.23 e Xq22.2) e uma nova rara (14q23.1). No grupo 2, 11 CNVs foram identificadas em mais de um paciente, sendo 10 raras (1p21.1, 3q26.1, 4q34.1, 6p21.33, 8p11.23, 11q11, 15q11.2, Xp21.3 e Xq22.2) e uma nova rara (11p11.2). Foram identificadas duas CNVs envolvendo a região cromossômica 6p21.33. Ambas estavam envolvidas em perdas genômicas e englobando os mesmos genes (*HLA-H* e *HCG2P7*), porém apresentavam tamanhos diferentes (19.463 pb e 32.798 pb). A alteração de maior tamanho estava ausente na população referência, porém também foi identificada em pacientes do grupo 1 (SM71 e SM174). Outras CNVs mapeadas em 1p31.1, 4q34.1, 6p11.2, 6p21.33, 11p11.2, 14q23.1, 15q11.2, Xp21.3 e Xq22.2 também foram identificadas em pacientes dos dois grupos amostrais. A alteração genômica detectada nas regiões cromossômicas 22q11.23 (Grupo 1) e 1p21.1, 3q26.1, 8p11.23, 11q11 (Grupo 2) foram exclusivas de cada grupo. Todas as CNVs, exceto a 6p21.33, identificadas em mais de um paciente estavam envolvidas em ganhos genômicos.

**Tabela 11** - Alterações novas raras e raras detectadas no grupo 1 após comparação com o grupo de referência.

<b>Novas Raras</b>											
Região Cromossômica	Casos	Start	End	Tamanho (pb)	Grupo Controle	Nº de Sondas	Evento	P valor	Genes	MicroRNA	Presença de CNVs
3p12.3	SM56	78990568	79028038	37470	0	4	P	5,29E-14	<i>ROBO1</i>	-	-
4q12	SM98	56785476	56809225	23749	0	3	G	5,32E-13	<i>KIAA1211</i>	-	-
6q24.3	VCS	146324451	146392895	68444	0	4	G	1,31E-13	<i>SHPRH, GRM1</i>	-	-
7p22.2	SM26	2513093	2536948	23855	0	3	G	1,32E-12	<i>LFNG</i>	-	-
7p22.2	VCS	2106885	2127052	20167	0	3	G	1,93E-16	<i>MAD1L1</i>	-	-
11p11.2	SM98	46965179	46988641	23462	0	3	G	1,08E-13	<i>C11orf49</i>	-	-
14q23.1	SM83	60588068	60606107	18039	0	3	G	3,54E-13	<i>SLC38A6</i>	-	-
	SM173	60588068	60606107	18039	0	3	G	4,27E-15	<i>SLC38A6</i>	-	-
14q32.11	SM98	89113111	89136415	23304	0	3	G	3,80E-12	<i>FOXN3, PRO1768</i>	-	-
19q13.32	VCS	52220023	52266884	46861	0	4	G	4,03E-14	<i>NPAS1, TMEM160, ZC3H4</i>	-	-
21q22.3	SM26	45195687	45218964	23277	0	3	G	7,76E-13	<i>C21orf70</i>	-	-
21q22.3	SM173	42682926	42756744	73818	0	8	G	6,18E-16	<i>TMPRSS3, UBASH3A</i>	-	-
<b>Raras</b>											
Região Cromossômica	Casos	Start	End	Tamanho (pb)	Grupo Controle	Nº de Sondas	Evento	P valor	Genes	MicroRNA	Presença de CNVs
1p31.1	SM5	72541243	72681514	140271	0	6	G	3,67E-19	-	-	++
	VCS	72541243	72681514	140271	0	6	G	6,61E-17	-	-	++
1p31.1	VCS	76801602	77352325	550723	0	34	P	1,33E-83	<i>ST6GALNAC3, ST6GALNAC5, PIGK</i>	-	+
1p31.1	SM4	72541243	72652273	111030	1%	5	G	3,34E-33	-	-	++
1p36.13	SM60	16887848	17104545	216697	0	6	P	4,02E-13	<i>ESPNP, MSTP9</i>	-	++
1p36.33	SM26	1217817	1436882	219065	0	4	G	1,90E-23	<i>ACAP3, PUSL1, CPSF3L, GLTPD1, TAS1R3, DVL1, MXRA8, AURKAIP1, CCNL2, LOC148413, MRPL20, LOC441869, TMEM88B, VWA1, ATAD3C, ATAD3B</i>	-	++
1q21.1	SM174	147203077	147510732	307655	1%	16	P	6,15E-21	<i>LOC645166</i>	-	++
1q25.1	SL167	173715270	173993630	278360	0	24	G	4,53E-56	<i>TNR</i>	-	+
2p11.2	SM44	89387396	89902565	515169	1%	17	P	2,79E-26	-	-	++
2p11.2 - p11.1	SM174	89231429	91270511	2039082	0	29	P	6,84E-29	<i>LOC654342</i>	-	++

**Cont/ Tabela 11**

Região Cromossômica	Casos	Start	End	Tamanho (pb)	Grupo Controle	Nº de Sondas	Evento	P valor	Genes	MicroRNA	Presença de CNVs
2p11.2 - p11.1	SM174	89231429	91270511	2039082	0	29	P	6,84E-29	<i>LOC654342</i>	-	++
2p21	SM98	44026550	44089677	63127	0	5	G	1,39E-13	<i>LRPPRC</i>	-	+
2q37.3	SM173	242572531	242596854	24323	1%	5	P	1,37E-19	-	-	++
3p14.2	SM98	60461801	60832267	370466	0	31	P	2,64E-87	<i>FHIT</i>	-	++
3p24.3	SM28	17702466	17733164	30698	1%	3	P	2,12E-14	<i>TBC1D5</i>	-	-
3q25.1	SM28	152973708	153025401	51693	0	6	P	1,58E-13	<i>LOC201651, AADAC</i>	-	+
3q26.1	SL167	164023302	164101976	78674	0	5	G	1,48E-24	-	-	++
4q34.1	SM4	173648289	173706608	58319	0	6	G	1,38E-16	<i>GALNTL6</i>	-	++
	SM83	173648289	173706608	58319	0	6	G	4,76E-15	<i>GALNTL6</i>	-	++
5q11.2	SM98	55595250	55858437	263187	0	13	G	1,59E-14	-	-	+
6p11.2	SM56	57354689	57598026	243337	0	21	P	2,43E-20	<i>PRIM2</i>	-	++
	SM98	57354689	57598026	243337	0	21	G	1,99E-18	<i>PRIM2</i>	-	++
6p21.32	SM65	32558477	32630048	71571	0	4	P	2,27E-20	<i>HLA-DRB5, HLA-DRB6</i>	-	++
6p21.33	SM71	29962649	29995447	32798	0	4	P	1,05E-24	<i>HLA-H, HCG2P7</i>	-	++
	SM174	29962649	29995447	32798	0	4	P	2,38E-13	<i>HLA-H, HCG2P7</i>	-	++
6q14.1	SM60	78930685	79080188	149503	0	6	G	4,85E-14	-	-	++
7p22.3	VCS	1234712	1275138	40426	0	4	G	4,67E-26	<i>UNCX</i>	-	++
7q22.1	SM26	100078445	100117194	38749	0	4	G	3,10E-12	<i>ACTL6B, GNB2, GIGYF1</i>	-	+
7q36.1	VCS	150385608	150402661	17053	0	3	G	7,03E-18	<i>CDK5, SLC4A2</i>	-	+
8p22	SM98	15996182	16066256	70074	0	7	P	2,67E-27	<i>MSR1, MSR1</i>	-	++
8p23.1	VCS	7260242	7791134	530892	0	6	G	4,86E-15	<i>DEFB103A, DEFB103B, SPAG11B, DEFB104A, DEFB104B, DEFB106B, DEFB106A, DEFB105B, DEFB105A, DEFB107A, DEFB107B, FAM90A7, SPAG11A, DEFB4</i>	-	++
8q22.2	SM44	100324211	100677923	353712	0	33	P	1,42E-95	<i>VPS13B</i>	hsa-mir-599, hsa-mir-875	+
9p23	SM98	11917481	11997247	79766	0	4	P	2,16E-17	-	-	++
9q34.2	VCS	136445503	136472396	26893	0	3	G	5,24E-20	<i>RXRA</i>	-	+

**Cont/ Tabela 11**

Região Cromossômica	Casos	Start	End	Tamanho (pb)	Grupo Controle	Nº de Sondas	Evento	P valor	Genes	MicroRNA	Presença de CNVs
10q11.21 - q11.22	SM5	45478133	47172734	1694601	0	26	G	2,25E-22	ANUBL1, FAM21C, AGAP4, PTPN20B, PTPN20A, FRMPD2L1, FRMPD2L2, BMS1P1, BMS1P5, SYT15, GPRIN2, PPYR1, LOC728643, ANXA8, ANXA8L1, FAM25C, FAM25G, FAM25B, LOC642826, ANTXRL	-	++
10q11.22	SM26	46404719	47104046	699327	0	18	P	1,65E-23	GPRIN2, PPYR1, LOC728643, ANXA8, ANXA8L1, FAM25C, FAM25G, FAM25B, LOC642826	-	++
10q22.3	SM98	79390845	79470057	79212	0	8	G	9,96E-14	POLR3A, RPS24, RPS24, RPS24	-	+
10q23.31	SL167	91117725	91616789	499064	0	40	G	1,66E-61	IFIT1L, IFIT1, IFIT5, SLC16A12, PANK1, FLJ37201, KIF20B	hsa-mir-107	+
11q24.2	SM76	123710241	123774277	64036	0	5	P	1,68E-18	OR8B2, OR8B3	-	+
11q25	SL155	133858824	134217023	358199	0	19	G	1,83E-33	-	-	++
12p12.3	SM83	16293026	16594803	301777	0	18	G	1,64E-35	MGST1, LMO3	-	+
12p13.31	SM173	9528390	9554349	25959	0	3	P	1,88E-16	-	-	++
13q21.1	SM5	56581739	56726208	144469	0	8	P	3,04E-14	PRR20, LOC729233, LOC729240, LOC729246, LOC729250, LOC729240,	-	++
14q11.2	SM56	19377090	19484213	107123	0	8	G	1,90E-28	OR4K2, OR4K5, OR4K1	-	++
15q11.2	SM4	19805760	20336087	530327	0	24	G	9,08E-30	LOC727924, OR4M2, OR4N4, LOC650137, GOLGA8D, LOC283767	hsa-mir-1268	++
15q11.2	SM48	18824422	20029853	1205431	0	43	G	1,85E-79	LOC727832, GOLGA8C, LOC646214, CXADRP2, POTE, LOC727924, OR4M2, OR4N4, LOC650137	hsa-mir-1268	++
15q11.2	SM98	18835460	20366870	1531410	0	47	G	5,64E-45	LOC727832, GOLGA8C, LOC646214, CXADRP2, POTE, LOC727924, OR4M2, OR4N4, LOC650137, GOLGA8D, LOC283767	hsa-mir-1268	++

Cont/ Tabela 11

Região Cromossômica	Casos	Start	End	Tamanho (pb)	Grupo Controle	Nº de Sondas	Evento	P valor	Genes	MicroRNA	Presença de CNVs
15q11.2	SM92	18692665	20060261	1367596	1%	47	G	5,46E-161	<i>LOC727832, GOLGA8C, LOC646214, CXADRP2, POTE, LOC727924, OR4M2, OR4N4, LOC650137</i>	hsa-mir-1268	++
	VCS	18692665	20060261	1367596	1%	47	G	8,21E-226	<i>LOC727832, GOLGA8C, LOC646214, CXADRP2, POTE, LOC727924, OR4M2, OR4N4, LOC650137</i>	hsa-mir-1268	++
15q25.3	SM5	84564656	84700852	136196	0	13	G	1,48E-19	<i>AGBL1</i>	-	+
15q25.3	SM98	84627424	84700852	73428	0	8	G	6,95E-13	<i>AGBL1</i>	-	+
16p13.3 - p13.2	SM76	6243005	6328849	85844	0	7	P	2,19E-21	<i>A2BP1</i>	-	+
17q25.3	SM28	75294309	75555217	260908	0	21	G	2,36E-21	<i>ENPP7, CBX2, CBX8, CBX4, TBC1D16</i>	-	++
18q12.1	VCS	27225938	27298267	72329	0	7	G	2,46E-19	<i>DSG4, DSG3</i>	-	+
19p12	SM26	20399500	20493601	94101	0	5	P	1,09E-13	<i>ZNF826</i>	-	++
19p13.3	VCS	721124	746808	25684	0	3	G	2,10E-13	-	-	+
20q13.33	SM26	60845336	60876102	30766	0	4	G	3,60E-15	<i>NTSR1</i>	-	+
21p11.2 - p11.1	SM5	9888612	10116158	227546	0	12	P	1,94E-15	<i>TPTE, BAGE5, BAGE4, BAGE3, BAGE2, BAGE</i>	-	++
22q11.21	VCS	18513409	18544726	31317	0	4	G	7,47E-18	<i>ZDHHC8</i>	-	++
22q11.23	SM28	23994418	24253362	258944	1%	21	G	2,14E-15	<i>IGLL3, LRP5L</i>	-	++
	SM173	23994418	24253362	258944	1%	21	P	4,42E-32	<i>IGLL3, LRP5L</i>	-	++
Xp21.3	SM98	26674328	26777592	103264	0	4	G	2,67E-13	-	-	+
Xp22.11	SM4	22870465	22931729	61264	0	6	P	4,40E-26	<i>DDX53</i>	-	+
Xq22.2	SM5	102927098	102980861	53763	0	6	G	3,54E-15	<i>PLP1, RAB9B</i>	-	+
	SM98	102927098	102980861	53763	0	6	G	7,13E-15	<i>PLP1, RAB9B</i>	-	+
Xq22.2	SM26	103072582	103174860	102278	0	10	G	1,83E-15	<i>TMSB15B, H2BFXP, H2BFWT</i>	-	++

P: perda genômica; G: ganho genômico; - ausente; + ≤3 CNVs descritas no DGV; ++ mais de 3 CNVs descritas no DGV.

**Tabela 12** - Alterações novas raras e raras detectadas no grupo 2 após comparação com o grupo de referência.

**Novas Raras**

Região Cromossômica	Casos	Start	End	Tamanho (pb)	Grupo Controle	Nº de Sondas	Evento	P valor	Genes	MicroRNA	Presença de CNVs
1q23.3	SM150	162030664	162091051	60387	0	5	P	1,66E-15	-	-	-
1q31.2	SM63	191625780	191727377	101597	0	3	P	9,18E-16	-	-	-
3p12.3	SM37	78990568	79028038	37470	0	4	P	1,19E-18	<i>ROBO1</i>	-	-
3p14.1	SM87	71124097	71233818	109721	0	9	G	6,46E-13	<i>FOXP1</i>	-	-
5p15.2	SM88	12752465	12787290	34825	0	3	P	1,17E-14	-	-	-
5q11.2	SM88	55603156	55657043	53887	0	5	G	5,95E-14	-	-	-
6p22.1	SM77	29201691	29260945	59254	0	6	P	3,31E-14	<i>OR2J2</i>	-	-
7p22.3	SL16	996692	1047907	51215	0	8	G	4,00E-14	<i>C7orf50</i>	hsa-mir-339	-
7q36.3	SM6	158001395	158021351	19956	0	5	P	1,25E-26	<i>PTPRN2</i>	hsa-mir-595	-
11p11.2	SM87	46965179	46988641	23462	0	3	G	2,01E-13	<i>C11orf49</i>	-	-
	SM88	46965179	46988641	23462	0	3	G	6,87E-13	<i>C11orf49</i>	-	-
13q14.3	SM37	49039910	49062297	22387	0	5	G	1,02E-20	<i>RCBTB1</i>	-	-
14q23.1	LFS144	60588068	60606107	18039	0	3	G	7,19E-16	<i>SLC38A6</i>	-	-
15q26.1	SM87	89111000	89147948	36948	0	5	G	3,70E-12	<i>BLM</i>	-	-
16q21	SM7	61782647	61890318	107671	0	5	P	6,82E-20	-	-	-
17q25.1	SM87	71478161	71511523	33362	0	3	G	8,68E-15	<i>ACOX1, LOC100134934, CDK3</i>	-	-
Xq13.1	SM87	71348690	71391442	42752	0	3	G	5,41E-14	<i>ERCC6L</i>	-	-

**Raras**

Região Cromossômica	Casos	Start	End	Tamanho (pb)	Grupo Controle	Nº de Sondas	Evento	P valor	Genes	MicroRNA	Presença de CNVs
1p21.1	SM88	103899571	104012720	113149	0	6	G	1,67E-13	<i>AMY2B, LOC648740, AMY2A, AMY1A, AMY1C, AMY1B</i>	-	++
	SL154	103899571	104012720	113149	0	6	G	1,74E-27	<i>AMY2B, LOC648740, AMY2A, AMY1A, AMY1C, AMY1B</i>	-	++
1p31.1	SM33	72541243	72681514	140271	0	6	G	4,93E-15	-	-	++

**Cont/ Tabela 12**

Região Cromossômica	Casos	Start	End	Tamanho (pb)	Grupo Controle	Nº de Sondas	Evento	P valor	Genes	MicroRNA	Presença de CNVs
1p36.33	SM47	842526	870300	27774	0	3	G	3,31E-12	<i>FLJ39609, SAMD11, NOC2L</i>	-	+
1p36.33	SM47	1147038	1436882	289844	0	9	G	2,34E-17	<i>SDF4, B3GALT6, FAM132A, UBE2J2, LOC100128842, SCNN1D, ACAP3, PUSL1, CPSF3L, GLTPD1, TAS1R3, DVL1, MXRA8, AURKAIP1, CCNL2, LOC148413, MRPL20, LOC441869, TMEM88B, VWA1, ATAD3C, ATAD3B</i>	-	++
1q21.1	SM77	147346171	147510732	164561	1%	13	P	7,64E-16	-	-	++
1q21.1 - q21.2	MT28	147203077	148081969	878892	1%	18	P	2,19E-14	<i>LOC645166, LOC645166, LOC388692, FCGR1C, PPIAL4C, PPIAL4A, LOC728855, FCGR1A, HIST2H2BF, HIST2H3D, HIST2H4A, HIST2H4B, HIST2H3C, HIST2H3A, HIST2H2AA4, HIST2H2AA3</i>	-	++
1q44	MT39	246805321	246875216	69895	1%	6	G	3,76E-13	<i>OR2T10, OR2T11, OR2T35</i>	-	++
2p11.2	SM47	89387396	89902565	515169	1%	17	P	6,11E-18	-	-	++
2p11.2	SM88	85641167	85677891	36724	0	4	G	6,92E-13	<i>GGCX, VAMP8, VAMP5, RNF181</i>	-	+
2p11.2 - p11.1	SL24	89387396	91057322	1669926	0	18	P	3,33E-24	-	-	++
2p11.2 - q11.1	MT16	89222763	94892966	5670203	0	31	P	5,90E-17	<i>LOC654342, GGT8P, ANKRD20B</i>	-	++
2p21	SM88	44026550	44089677	63127	0	5	G	9,13E-13	<i>LRPPRC</i>	-	+
2p22.2	SL55	38254265	38346267	92002	0	9	P	2,03E-28	<i>C2orf58</i>	-	+
2q32.1	SM47	186064414	186277467	213053	0	10	P	1,13E-21	-	-	+
2q37.3	SM150	242514393	242666698	152305	0	13	P	3,87E-25	-	-	++
3p24.2	SM64	26254389	26371477	117088	0	4	P	2,07E-14	-	-	+
3q26.1	SM64	163977134	164101976	124842	0	7	G	1,47E-14	-	-	++
	SM100	163977134	164101976	124842	0	7	G	1,15E-16	-	-	++

**Cont/ Tabela 12**

Região Cromossômica	Casos	Start	End	Tamanho (pb)	Grupo Controle	Nº de Sondas	Evento	P valor	Genes	MicroRNA	Presença de CNVs
3q29	SM34	198515487	199044044	528557	0	37	P	5,97E-95	<i>BDH1, LOC220729, KIAA0226, FYT1D1, LRCH3</i>	hsa-mir-922	++
4p16.3	SM47	663477	1721606	1058129	0	79	G	1,73E-28	<i>MYL5, MFSD7, PCGF3, CPLX1, GAK, TMEM175, DGKQ, SLC26A1, IDUA, SLC26A1, FGFR1, RNF212, SPON2, LOC100130872, CTBP1, C4orf42, MAEA, KIAA1530, CRIPAK, FAM53A, SLBP, TMEM129, TACC3</i>	-	++
4p16.3	SM87	61352	107546	46194	0	4	G	2,27E-15	<i>ZNF595, ZNF718</i>	-	++
4q22.2 - q35.2	SM100	94533109	191028016	96494907	0	4905	G	0	Vários	Vários	++
4q27 - q28.1	MT5	123962674	124438167	475493	0	41	G	1,29E-31	<i>FGF2, NUDT6, SPATA5</i>	-	+
4q31.22	SM37	145061838	145197056	135218	0	5	P	1,65E-18	<i>GYPB</i>	-	++
4q32.2	SM63	162088801	162147533	58732	0	4	G	7,64E-17	-	-	++
4q34.1	SM7	173648289	173706608	58319	0	6	G	1,50E-12	<i>GALNTL6</i>	-	++
	LFS144	173648289	173706608	58319	0	6	G	9,80E-15	<i>GALNTL6</i>	-	++
4q34.1	SM87	173687683	173706608	18925	0	3	G	2,09E-12	<i>GALNTL6</i>	-	+
4q35.2	SM19	189868084	190768054	899970	0	50	G	5,10E-67	-	-	++
4q35.2	SM101	190850927	190887401	36474	0	3	G	4,67E-15	-	-	++
5p15.2	SM12	12645163	12722931	77768	0	4	P	8,62E-13	-	-	+
6p11.2	SM47	57354689	57598026	243337	0	21	P	4,15E-18	<i>PRIM2</i>	-	++
6p11.2	SM87	57377759	57598026	220267	0	19	G	5,25E-18	<i>PRIM2</i>	-	++
6p11.2	SM88	57385552	57598026	212474	0	18	G	3,89E-16	<i>PRIM2</i>	-	++
6p21.33	SM6	29962649	29982112	19463	1%	3	P	1,71E-15	<i>HLA-H, HCG2P7</i>	-	++
	SL55	29962649	29982112	19463	1%	3	P	6,14E-35	<i>HLA-H, HCG2P7</i>	-	++
	MT39	29962649	29982112	19463	1%	3	P	4,00E-29	<i>HLA-H, HCG2P7</i>	-	++
6p21.33	SM64	29962649	29995447	32798	0	4	P	9,52E-18	<i>HLA-H, HCG2P7</i>	-	++
	SM100	29962649	29995447	32798	0	4	P	8,61E-15	<i>HLA-H, HCG2P7</i>	-	++
6p21.33	SM88	29950605	30004836	54231	0	6	P	1,69E-17	<i>HLA-H, HCG2P7, HCG4P6</i>	-	++
6p25.3	SM100	129579	455857	326278	0	24	G	5,58E-17	<i>DUSP22, IRF4, EXOC2</i>	-	++
6q12	SM34	65552358	65828618	276260	0	18	P	3,27E-41	<i>EYS</i>	-	+

Cont/ Tabela 12

Região Cromossômica	Casos	Start	End	Tamanho (pb)	Grupo Controle	Nº de Sondas	Evento	P valor	Genes	MicroRNA	Presença de CNVs
6q27	SM33	168081402	168324202	242800	0	16	G	1,12E-28	<i>MLLT4, HGC6.3, KIF25, FRMD1</i>	-	++
7p12.1	MT5	53428317	53550819	122502	1%	7	P	6,03E-17	-	-	++
7p22.2	SM12	4325467	4494595	169128	0	8	P	8,02E-26	-	-	++
7p22.3	SL16	1234712	1264286	29574	0	3	G	2,13E-22	<i>UNCX</i>	-	++
7q21.13	SM12	89582137	90167047	584910	0	45	G	4,78E-63	<i>DPY19L2P4, STEAP1, STEAP2, C7orf63, GTPBP10, CLDN12</i>	-	++
7q31.31	SM87	120298740	120426730	127990	0	12	G	1,17E-15	<i>ING3, C7orf58</i>	-	+
8p11.23	SM33	39356395	39464777	108382	1%	10	G	4,66E-19	<i>ADAM5P, ADAM3A</i>	-	++
	SM63	39356395	39464777	108382	1%	10	G	6,46E-51	<i>ADAM5P, ADAM3A</i>	-	++
8p11.23	SL16	39356395	39378251	21856	0	3	P	4,36E-28	<i>ADAM5P</i>	-	++
8p11.23 - p11.22	SM7	39356395	39511832	155437	0	13	P	7,59E-15	<i>ADAM5P, ADAM3A</i>	-	++
8p23.2	SM7	2337083	2546879	209796	0	10	P	7,52E-42	-	-	++
8p23.3	SM100	897434	964825	67391	0	4	P	1,31E-19	-	-	++
9p23	SM63	11942322	12104438	162116	0	6	P	8,50E-28	-	-	++
9p23	SM150	12153030	12239707	86677	0	4	P	5,00E-15	-	-	++
10p15.3	SL154	1204016	1706887	502871	0	38	P	1,52E-21	<i>ADARB2, NCRNA00168</i>	-	+
10q11.21	SM150	44567491	44669960	102469	1%	6	G	6,31E-16	-	-	++
10q11.22	SM37	46395963	46568696	172733	1%	14	P	9,20E-33	<i>GPRIN2, PPYR1, LOC728643</i>	-	++
10q11.22	MT39	46395963	47172734	776771	1%	24	P	2,59E-20	<i>GPRIN2, PPYR1, LOC728643, ANXA8, ANXA8L1, FAM25C, FAM25G, FAM25B, LOC642826, ANTXRL</i>	-	++
10q26.3	SM88	135103829	135227663	123834	1%	11	P	8,45E-35	<i>LOC619207, CYP2E1, SYCE1</i>	-	++
11p15.5	SM47	1941455	1993369	51914	0	8	G	3,76E-14	<i>LOC100133545, H19</i>	hsa-mir-675	++
11q11	SM7	55141993	55207505	65512	0	7	G	2,22E-16	<i>OR4P4, OR4S2, OR4C6</i>	-	++
	SM150	55141993	55207505	65512	0	7	G	2,15E-16	<i>OR4P4, OR4S2, OR4C6</i>	-	++
11q11	SM100	55157878	55187482	29604	0	4	P	3,20E-13	<i>OR4P4, OR4S2</i>	-	++
11q25	SM19	133858824	134217023	358199	0	19	G	6,52E-26	-	-	++
12p13.31	SM33	9528390	9589925	61535	1%	6	G	2,93E-15	-	-	++
12q24.33	SM87	130299107	130381490	82383	0	6	P	1,09E-37	-	-	++

Cont/ Tabela 12

Região Cromossômica	Casos	Start	End	Tamanho (pb)	Grupo Controle	Nº de Sondas	Evento	P valor	Genes	MicroRNA	Presença de CNVs
13q21.1	SM63	56610686	56691555	80869	0	5	P	1,42E-25	PRR20, LOC729233, LOC729240, LOC729246, LOC729250	-	++
13q21.32	SM34	64630281	64779577	149296	0	6	P	3,85E-16	-	-	+
13q31.1	SM47	83920574	83973495	52921	0	4	G	4,34E-14	-	-	+
14q11.2	SM7	19286928	19484213	197285	0	11	G	1,59E-16	OR4M1, OR4N2, OR4K2, OR4K5, OR4K1	-	++
14q24.3	SM59	73060101	73092218	32117	0	4	P	4,36E-14	HEATR4, ACOT1	-	++
14q32.33	SM47	103627065	103644481	17416	0	4	G	7,57E-15	ASPG	-	+
14q32.33	SM100	105856772	106312055	455283	0	38	G	1,66E-21	LOC100133469	-	++
14q32.33	SM100	105602402	105848535	246133	1%	18	P	9,83E-58	-	-	++
14q32.33	SL24	105962105	106002379	40274	1%	5	P	3,60E-20	-	-	++
15q11.2	SM12	18741516	19882911	1141395	0	30	G	2,59E-39	LOC727832, GOLGA8C, LOC646214, CXADRP2, POTE, LOC727924, OR4M2	-	++
15q11.2	SM33	18862856	20336087	1473231	0	44	G	7,22E-106	LOC727832, GOLGA8C, LOC646214, CXADRP2, POTE, LOC727924, OR4M2, OR4N4, LOC650137, GOLGA8D, LOC283767	hsa-mir-1268	++
15q11.2	SM59	18692665	20060261	1367596	1%	47	G	1,35E-36	LOC727832, GOLGA8C, LOC646214, CXADRP2, POTE, LOC727924, OR4M2, OR4N4, LOC650137	hsa-mir-1268	++
15q11.2	SM67	18692665	19882911	1190246	1%	31	G	2,32E-80	LOC727832, GOLGA8C, LOC646214, CXADRP2, POTE, LOC727924, OR4M2	-	++
15q11.2	SM87	18692665	20336087	1643422	0	49	G	3,40E-67	LOC727832, GOLGA8C, LOC646214, CXADRP2, POTE, LOC727924, OR4M2, OR4N4, LOC650137, GOLGA8D, LOC283767	hsa-mir-1268	++
15q11.2	SM88	19146396	20366870	1220474	0	40	G	4,64E-21	LOC646214, CXADRP2, POTE, LOC727924, OR4M2, OR4N4, LOC650137, GOLGA8D, LOC283767	hsa-mir-1268	++

**Cont/ Tabela 11**

Região Cromossômica	Casos	Start	End	Tamanho (pb)	Grupo Controle	Nº de Sondas	Evento	P valor	Genes	MicroRNA	Presença de CNVs
15q11.2	MT16	18450362	19882911	1432549	0	32	G	8,83E-59	LOC727832, GOLGA8C, LOC646214, CXADRP2, POTEb, LOC727924, OR4M2	-	++
15q11.2	MT39	18741516	20317192	1575676	0	47	P	2,61E-27	LOC727832, GOLGA8C, LOC646214, CXADRP2, POTEb, LOC727924, OR4M2, OR4N4, LOC650137, GOLGA8D, LOC283767	hsa-mir-1268	++
15q11.2	SL154	18450362	20060261	1609899	1%	48	G	2,72E-74	LOC727832, GOLGA8C, LOC646214, CXADRP2, POTEb, LOC727924, OR4M2, OR4N4, LOC650137	hsa-mir-1268	++
	MT67	18450362	20060261	1609899	1%	48	G	1,26E-33	LOC727832, GOLGA8C, LOC646214, CXADRP2, POTEb, LOC727924, OR4M2, OR4N4, LOC650137	hsa-mir-1268	++
15q21.3	SM33	54484950	54513771	28821	0	5	G	2,74E-14	TEX9, MNS1	-	++
15q21.3	SM87	54497983	54513771	15788	0	3	G	7,71E-15	TEX9, MNS1	-	++
16p11.2	SM47	29238604	30104991	866387	0	48	G	5,53E-31	RUNDC2C, LOC606724, BOLA2, BOLA2B, GIYD1, GIYD2, SULT1A3, SULT1A4, LOC388242, LOC613038, LOC440354, SLC7A5P1, SPN, QPRT, C16orf54, MAZ, PRRT2, C16orf53, MVP, CDIPT, LOC440356, SEZ6L2, ASPHD1, KCTD13, TMEM219, TAOK2, HIRIP3, INO80E, DOC2A, C16orf92, FAM57B, ALDOA, PPP4C, TBX6, YPEL3, GDPD3, MAPK3, LOC100271831, CORO1A	-	++
16p11.2	MT28	32481109	33559407	1078298	1%	19	G	6,54E-15	LOC729355, TP53TG3, SLC6A10P,	-	++
16p11.2 - p11.1	SM87	34309887	34584993	275106	0	10	G	1,49E-14	LOC283914, LOC283914, LOC146481	-	++

Cont/ Tabela 11

Região Cromossômica	Casos	Start	End	Tamanho (pb)	Grupo Controle	Nº de Sondas	Evento	P valor	Genes	MicroRNA	Presença de CNVs
16p13.3	SM47	447079	1440204	993125	0	84	G	2,14E-31	<i>RAB11FIP3, C16orf10, SOLH, C16orf11, FLJ36208, PIGQ, RAB40C, WFIKKN1, C16orf13, C16orf14, WDR90, RHOT2, RHBDL1, STUB1, JMJD8, WDR24, FBXL16, METRN, FAM173A, CCDC78, HAGHL, HAGHL, NARFL, MSLN, MSLNL, RPUSD1, CHTF18, GNG13, LOC388199, LMF1, SOX8, LOC146336, SSTR5, C1QTNF8, CACNA1H, TPSG1, TPSB2, TPSAB1, TPSD1, LOC100130430, UBE2I, UBE2I, BAIAP3, C16orf42, GNPTG, UNKL, C16orf91, CCDC154, CLCN7</i>	hsa-mir-662	++
16q22.3	MT67	72929586	72964983	35397	1%	4	P	7,59E-13	<i>LOC283922</i>	-	++
17q21.31	SL154	41553026	41653061	100035	0	9	G	3,39E-15	<i>KIAA1267</i>	-	++
17q25.3	SM47	76680753	77053383	372630	0	33	G	2,38E-23	<i>BAIAP2, AATK, LOC388428, AZI1, C17orf56, C17orf89, SLC38A10, C17orf55, TMEM105, BAHCC1</i>	hsa-mir-657, hsa-mir-338, hsa-mir-1250	++
18p11.32	SL154	1909485	1970987	61502	0	5	P	2,76E-13	-	-	++
20p12.1	MT67	14746898	14832929	86031	0	8	P	1,52E-15	<i>MACROD2</i>	-	++
20p12.3	SM34	8163519	8216565	53046	0	4	P	2,97E-12	<i>PLCB1</i>	-	++
20p13	SM64	69321	124381	55060	0	5	P	8,83E-31	<i>DEFB126, DEFB127, DEFB128</i>	-	+
20q13.33	SM47	60845336	60876102	30766	0	4	G	6,39E-13	<i>NTSR1</i>	-	+

### Cont/ Tabela 11

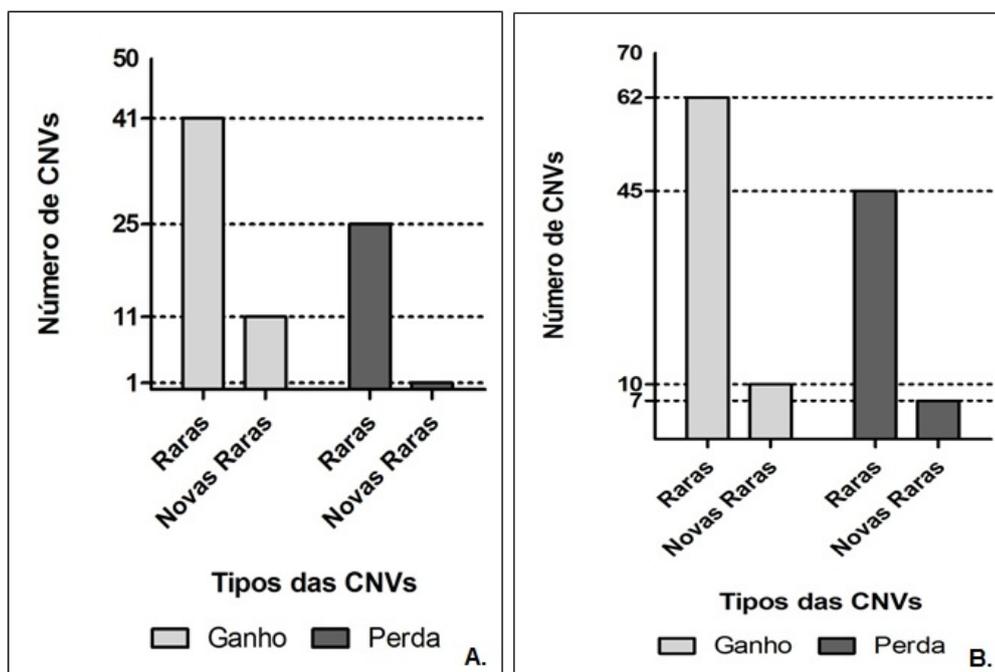
Região Cromossômica	Casos	Start	End	Tamanho (pb)	Grupo Controle	Nº de Sondas	Evento	P valor	Genes	MicroRNA	Presença de CNVs
22q13.1	SM47	38315615	38389382	73767	0	7	G	2,34E-25	<i>CACNA1I</i>	-	+
Xp21.3	SM33	26674328	26777592	103264	0	4	G	2,96E-15	-	-	+
	SM87	26674328	26777592	103264	0	4	G	1,10E-15	-	-	+
Xq22.2	SM87	102927098	102980861	53763	0	6	G	3,49E-13	<i>PLP1, RAB9B</i>	-	+
	SM88	102927098	102980861	53763	0	6	G	9,80E-15	<i>PLP1, RAB9B</i>	-	+

P: perda genômica; G: ganho genômico; - ausente; + ≤3 CNVs descritas no DGV; ++ mais de 3 CNVs descritas no DGV.

No **grupo 1**, 41 das 66 CNVs raras estavam envolvidas em ganhos (15.788 a 1.694.601 pb) e 25 em perdas genômicas (24.323 a 2.039.082 pb). Onze das 12 CNVs novas raras compreendiam regiões de ganho (18.093 a 73.818 pb) e uma de perda genômica (37.470 pb) (Figura 8A).

No **grupo 2**, 62 das 107 CNVs raras estavam envolvidas em ganhos (15.788 a 96.494.907 pb) e 45 em perdas genômicas (19.463 a 5.670.203 pb). Entre as CNVs novas raras, 10 das 17 estavam associadas a ganhos (18.039 a 109.721 pb) e 7 em perdas genômicas (19.956 a 107.671 pb) (Figura 8B).

Assim, os dois grupos de casos apresentaram um número maior de ganhos do que perdas tanto das CNVs raras como das novas raras (Figura 9).



**Figura 9** - Representação gráfica do número de CNVs raras e novas raras envolvidas em ganhos e perdas genômicas. **A.** CNVs detectadas no grupo 1. **B.** CNVs detectadas no grupo 2.

As CNVs raras e novas raras foram comparadas dentro e entre os grupos de pacientes para identificar quais eram exclusivas ou presentes em mais de um caso.

Entre as alterações raras, foram identificadas 12 regiões cromossômicas comuns aos dois grupos (nove ganhos, duas perdas e uma perda/ganho), 47 eram exclusivas do grupo 1 (26 ganhos, 20 perdas e uma perda/ganho) e 84 exclusivas do grupo 2 (45 ganhos e 39 perdas genômicas) (Tabela 13).

Entre as alterações novas raras, foram identificadas três regiões cromossômicas comuns aos dois grupos (dois ganhos e uma perda genômica), oito regiões exclusivas do grupo 1 envolvidas em ganhos e 13 exclusivas do grupo 2 (sete ganhos e seis perdas genômicas) (Tabela 13).

**Tabela 13** - Alterações raras comuns aos grupos 1 e 2 ou exclusivas de cada grupo, após comparação com o grupo de referência.

**CNVs Raras Comuns G1 e G2**

Região Cromossômica	Casos	Start	End	Tamanho (pb)	Grupo Controle	Nº de Sondas	Evento	P valor	Genes	MicroRNA	Presença de CNVs
1p31.1	SM5 (G1)	72541243	72681514	140271	0	6	G	3,67E-19	-	-	++
	SM33 (G2)	72541243	72681514	140271	0	6	G	4,93E-15	-	-	++
	VCS (G1)	72541243	72681514	140271	0	6	G	6,61E-17	-	-	++
2p11.2	SM44 (G1)	89387396	89902565	515169	1%	17	P	2,79E-26	-	-	++
	SM47 (G2)	89387396	89902565	515169	1%	17	P	6,11E-18	-	-	++
2p21	SM88 (G2)	44026550	44089677	63127	0	5	G	9,13E-13	<i>LRPPRC</i>	-	+
	SM98 (G1)	44026550	44089677	63127	0	5	G	1,39E-13	<i>LRPPRC</i>	-	+
4q34.1	SM4 (G1)	1,74E+08	1,74E+08	58319	0	6	G	1,38E-16	<i>GALNTL6</i>	-	++
	SM7 (G2)	1,74E+08	1,74E+08	58319	0	6	G	1,50E-12	<i>GALNTL6</i>	-	++
	SM83 (G1)	1,74E+08	1,74E+08	58319	0	6	G	4,76E-15	<i>GALNTL6</i>	-	++
	LFS144 (G2)	1,74E+08	1,74E+08	58319	0	6	G	9,80E-15	<i>GALNTL6</i>	-	++
6p11.2	SM47 (G2)	57354689	57598026	243337	0	21	P	4,15E-18	<i>PRIM2</i>	-	++
	SM56 (G1)	57354689	57598026	243337	0	21	P	2,43E-20	<i>PRIM2</i>	-	++
	SM98 (G1)	57354689	57598026	243337	0	21	G	1,99E-18	<i>PRIM2</i>	-	++
6p21.33	SM7 (G2)1	29962649	29995447	32798	0	4	P	1,05E-24	<i>HLA-H, HCG2P7</i>	-	++
	SM64 (G2)	29962649	29995447	32798	0	4	P	9,52E-18	<i>HLA-H, HCG2P7</i>	-	++
	SM100 (G2)	29962649	29995447	32798	0	4	P	8,61E-15	<i>HLA-H, HCG2P7</i>	-	++
	SM174 (G1)	29962649	29995447	32798	0	4	P	2,38E-13	<i>HLA-H, HCG2P7</i>	-	++
11q25	SM19 (G2)	1,34E+08	1,34E+08	358199	0	19	G	6,52E-26	-	-	++
	SL155 (G1)	1,34E+08	1,34E+08	358199	0	19	G	1,83E-33	-	-	++

**Cont/ Tabela 13**

Região Cromossômica	Casos	Start	End	Tamanho (pb)	Grupo Controle	Nº de Sondas	Evento	P valor	Genes	MicroRNA	Presença de CNVs
	SM59 (G2)	18692665	20060261	1367596	1%	47	G	1,35E-36	<i>LOC727832, GOLGA8C, LOC646214, CXADRP2, POTE, LOC727924, OR4M2, OR4N4, LOC650137</i>	hsa-mir-1268	++
15q11.2	SM92 (G1)	18692665	20060261	1367596	1%	47	G	5,46E-161	<i>LOC727832, GOLGA8C, LOC646214, CXADRP2, POTE, LOC727924, OR4M2, OR4N4, LOC650137</i>	hsa-mir-1268	++
	VCS (G1)	18692665	20060261	1367596	1%	47	G	8,21E-226	<i>LOC727832, GOLGA8C, LOC646214, CXADRP2, POTE, LOC727924, OR4M2, OR4N4, LOC650137</i>	hsa-mir-1268	++
15q21.3	SM87 (G2)	54497983	54513771	15788	0	3	G	7,71E-15	<i>TEX9, MNS1</i>	-	++
	VCS (G1)	54497983	54513771	15788	0	3	G	6,06E-14	<i>TEX9, MNS1</i>	-	++
20q13.33	SM26 (G1)	60845336	60876102	30766	0	4	G	3,60E-15	<i>NTSR1</i>	-	+
	SM47 (G2)	60845336	60876102	30766	0	4	G	6,39E-13	<i>NTSR1</i>	-	+
Xp21.3	SM33 (G2)	26674328	26777592	103264	0	4	G	2,96E-15	-	-	+
	SM87 (G2)	26674328	26777592	103264	0	4	G	1,10E-15	-	-	+
	SM98 (G1)	26674328	26777592	103264	0	4	G	2,67E-13	-	-	+
Xq22.2	SM5 (G1)	1,03E+08	1,03E+08	53763	0	6	G	3,54E-15	<i>PLP1, RAB9B</i>	-	+
	SM87 (G2)	1,03E+08	1,03E+08	53763	0	6	G	3,49E-13	<i>PLP1, RAB9B</i>	-	+
	SM88 (G2)	1,03E+08	1,03E+08	53763	0	6	G	9,80E-15	<i>PLP1, RAB9B</i>	-	+
	SM98 (G1)	1,03E+08	1,03E+08	53763	0	6	G	7,13E-15	<i>PLP1, RAB9B</i>	-	+

## Cont/ Tabela 13

### CNVs Raras Exclusivas G1

Região Cromossômica	Casos	Start	End	Tamanho (pb)	Grupo Controle	Nº de Sondas	Evento	P valor	Genes	MicroRNA	Presença de CNVs
1p31.1	SM4	72541243	72652273	111030	1%	5	G	3,34E-33	-	-	++
1p31.1	VCS	76801602	77352325	550723	0	34	P	1,33E-83	ST6GALNAC3, ST6GALNAC5, PIGK	-	+
1p36.13	SM60	16887848	17104545	216697	0	6	P	4,02E-13	ESPNP, MSTP9	-	++
1p36.33	SM26	1217817	1436882	219065	0	4	G	1,90E-23	ACAP3, PUSL1, CPSF3L, GLTPD1, TAS1R3, DVL1, MXRA8, AURKAIP1, CCNL2, LOC148413, MRPL20, LOC441869, TMEM88B, VWA1, ATAD3C, ATAD3B	-	++
1q21.1	SM174	1,47E+08	1,48E+08	307655	1%	16	P	6,15E-21	LOC645166, LOC645166	-	++
1q25.1	SL167	1,74E+08	1,74E+08	278360	0	24	G	4,53E-56	TNR	-	+
2p11.2 - p11.1	SM174	89231429	91270511	2039082	0	29	P	6,84E-29	LOC654342	-	++
2q37.3	SM173	2,43E+08	2,43E+08	24323	1%	5	P	1,37E-19	-	-	++
3p14.2	SM98	60461801	60832267	370466	0	31	P	2,64E-87	FHIT	-	++
3p24.3	SM28	17702466	17733164	30698	1%	3	P	2,12E-14	TBC1D5	-	-
3q25.1	SM28	1,53E+08	1,53E+08	51693	0	6	P	1,58E-13	LOC201651, AADAC	-	+
3q26.1	SL167	1,64E+08	1,64E+08	78674	0	5	G	1,48E-24	-	-	++
5q11.2	SM98	55595250	55858437	263187	0	13	G	1,59E-14	-	-	+
6p21.32	SM65	32558477	32630048	71571	0	4	P	2,27E-20	HLA-DRB5, HLA-DRB6	-	++
6q14.1	SM60	78930685	79080188	149503	0	6	G	4,85E-14	-	-	++
7p22.3	VCS	1234712	1275138	40426	0	4	G	4,67E-26	UNCX	-	++
7q22.1	SM26	1E+08	1E+08	38749	0	4	G	3,10E-12	ACTL6B, GNB2, GIGYF1	-	+
7q36.1	VCS	1,5E+08	1,5E+08	17053	0	3	G	7,03E-18	CDK5, SLC4A2	-	+
8p22	SM98	15996182	16066256	70074	0	7	P	2,67E-27	MSR1	-	++

### Cont/ Tabela 13

Região Cromossômica	Casos	Start	End	Tamanho (pb)	Grupo Controle	Nº de Sondas	Evento	P valor	Genes	MicroRNA	Presença de CNVs
8p23.1	VCS	7260242	7791134	530892	0	6	G	4,86E-15	<i>DEFB103A, DEFB103B, SPAG11B, SPAG11B, DEFB104A, DEFB104B, DEFB106B, DEFB106A, DEFB105B, DEFB105A, DEFB107A, DEFB107B, FAM90A7, DEFB4</i>	-	++
8q22.2	SM44	1E+08	1,01E+08	353712	0	33	P	1,42E-95	<i>VPS13B</i>	hsa-mir-599, hsa-mir-875	+
9p23	SM98	11917481	11997247	79766	0	4	P	2,16E-17	-	-	++
9q34.2	VCS	1,36E+08	1,36E+08	26893	0	3	G	5,24E-20	<i>RXRA</i>	-	+
10q11.21 - q11.22	SM5	45478133	47172734	1694601	0	26	G	2,25E-22	<i>ANUBL1, FAM21C, AGAP4, PTPN20B, PTPN20A, FRMPD2L1, FRMPD2L2, FRMPD2L1, FRMPD2L2, BMS1P1, BMS1P5, SYT15, GPRIN2, PPYR1, LOC728643, ANXA8, ANXA8L1, FAM25C, FAM25G, FAM25B, LOC642826, ANTXRL</i>	-	++
10q11.22	SM26	46404719	47104046	699327	0	18	P	1,65E-23	<i>GPRIN2, PPYR1, LOC728643, ANXA8, ANXA8L1, FAM25C, FAM25G, FAM25B, LOC642826</i>	-	++
10q22.3	SM98	79390845	79470057	79212	0	8	G	9,96E-14	<i>POLR3A, RPS24, RPS24, RPS24</i>	-	+
10q23.31	SL167	91117725	91616789	499064	0	40	G	1,66E-61	<i>IFIT1L, IFIT1, IFIT5, SLC16A12, PANK1, PANK1, FLJ37201, KIF20B</i>	hsa-mir-107	+
11q24.2	SM76	1,24E+08	1,24E+08	64036	0	5	P	1,68E-18	<i>OR8B2, OR8B3</i>	-	+
12p12.3	SM83	16293026	16594803	301777	0	18	G	1,64E-35	<i>MGST1, MGST1, MGST1, MGST1, LMO3, LMO3</i>	-	+
12p13.31	SM173	9528390	9554349	25959	0	3	P	1,88E-16	-	-	++

**Cont/ Tabela 13**

Região Cromossômica	Casos	Start	End	Tamanho (pb)	Grupo Controle	Nº de Sondas	Evento	P valor	Genes	MicroRNA	Presença de CNVs
13q21.1	SM5	56581739	56726208	144469	0	8	P	3,04E-14	<i>PRR20, LOC729233, LOC729240, LOC729246, LOC729250, LOC729240,</i>	-	++
14q11.2	SM56	19377090	19484213	107123	0	8	G	1,90E-28	<i>OR4K2, OR4K5, OR4K1</i>	-	++
15q11.2	SM4	19805760	20336087	530327	0	24	G	9,08E-30	<i>LOC727924, OR4M2, OR4N4, LOC650137, GOLGA8D, LOC283767</i>	hsa-mir-1268	++
15q11.2	SM48	18824422	20029853	1205431	0	43	G	1,85E-79	<i>LOC727832, GOLGA8C, LOC646214, CXADRP2, POTE, LOC727924, OR4M2, OR4N4, LOC650137</i>	hsa-mir-1268	++
15q11.2	SM98	18835460	20366870	1531410	0	47	G	5,64E-45	<i>LOC727832, GOLGA8C, LOC646214, CXADRP2, POTE, LOC727924, OR4M2, OR4N4, LOC650137, GOLGA8D, LOC283767</i>	hsa-mir-1268	++
15q25.3	SM5	84564656	84700852	136196	0	13	G	1,48E-19	<i>AGBL1</i>	-	+
15q25.3	SM98	84627424	84700852	73428	0	8	G	6,95E-13	<i>AGBL1</i>	-	+
16p13.3 - p13.2	SM76	6243005	6328849	85844	0	7	P	2,19E-21	<i>A2BP1</i>	-	+
17q25.3	SM28	75294309	75555217	260908	0	21	G	2,36E-21	<i>ENPP7, CBX2, CBX2, CBX8, CBX4, TBC1D16</i>	-	++
18q12.1	VCS	27225938	27298267	72329	0	7	G	2,46E-19	<i>DSG4, DSG4, DSG3</i>	-	+
19p12	SM26	20399500	20493601	94101	0	5	P	1,09E-13	<i>ZNF826</i>	-	++
19p13.3	VCS	721124	746808	25684	0	3	G	2,10E-13	-	-	+
21p11.2 - p11.1	SM5	9888612	10116158	227546	0	12	P	1,94E-15	<i>TPTE, BAGE5, BAGE4, BAGE3, BAGE2, BAGE</i>	-	++
22q11.21	VCS	18513409	18544726	31317	0	4	G	7,47E-18	<i>ZDHH8</i>	-	++
22q11.23	SM28	23994418	24253362	258944	1%	21	G	2,14E-15	<i>IGLL3, LRP5L</i>	-	++
	SM173	23994418	24253362	258944	1%	21	P	4,42E-32	<i>IGLL3, LRP5L</i>	-	++
Xp22.11	SM4	22870465	22931729	61264	0	6	P	4,40E-26	<i>DDX53</i>	-	+
Xq22.2	SM26	1,03E+08	1,03E+08	102278	0	10	G	1,83E-15	<i>TMSB15B, H2BFXP, H2BFWT</i>	-	++

## Cont/ Tabela 13

### CNVs Raras Exclusivas G2

Região Cromossômica	Casos	Start	End	Tamanho (pb)	Grupo Controle	Nº de Sondas	Evento	P valor	Genes	MicroRNA	Presença de CNVs
1p21.1	SM88	1,04E+08	1,04E+08	113149	0	6	G	1,67E-13	AMY2B, LOC648740, AMY2A, AMY1A, AMY1C, AMY1B	-	++
	SL154	1,04E+08	1,04E+08	113149	0	6	G	1,74E-27	AMY2B, LOC648740, AMY2A, AMY1A, AMY1C, AMY1B	-	++
1p36.33	SM47	842526	870300	27774	0	3	G	3,31E-12	FLJ39609, SAMD11, NOC2L	-	+
1p36.33	SM47	1147038	1436882	289844	0	9	G	2,34E-17	SDF4, B3GALT6, FAM132A, UBE2J2, LOC100128842, SCNN1D, ACAP3, PUSL1, CPSF3L, GLTPD1, TAS1R3, DVL1, MXRA8, AURKAIP1, CCNL2, LOC148413, MRPL20, LOC441869, TMEM88B, VWA1, ATAD3C, ATAD3B	-	++
1q21.1	SM77	1,47E+08	1,48E+08	164561	1%	13	P	7,64E-16	-	-	++
1q21.1 - q21.2	MT28	1,47E+08	1,48E+08	878892	1%	18	P	2,19E-14	LOC645166, LOC645166, LOC388692, FCGR1C, PPIAL4C, PPIAL4A, LOC728855, FCGR1A, HIST2H2BF, HIST2H3D, HIST2H4A, HIST2H4B, HIST2H3C, HIST2H3A, HIST2H2AA4, HIST2H2AA3	-	++
1q44	MT39	2,47E+08	2,47E+08	69895	1%	6	G	3,76E-13	OR2T10, OR2T11, OR2T35	-	++
2p11.2	SM88	85641167	85677891	36724	0	4	G	6,92E-13	GGCX, VAMP8, VAMP5, RNF181	-	+
2p11.2 - p11.1	SL24	89387396	91057322	1669926	0	18	P	3,33E-24	-	-	++
2p11.2 - q11.1	MT16	89222763	94892966	5670203	0	31	P	5,90E-17	LOC654342, GGT8P, ANKRD20B	-	++
2p22.2	SL55	38254265	38346267	92002	0	9	P	2,03E-28	C2orf58	-	+
2q32.1	SM47	1,86E+08	1,86E+08	213053	0	10	P	1,13E-21	-	-	+
2q37.3	SM150	2,43E+08	2,43E+08	152305	0	13	P	3,87E-25	-	-	++
3p24.2	SM64	26254389	26371477	117088	0	4	P	2,07E-14	-	-	+
3q26.1	SM64	1,64E+08	1,64E+08	124842	0	7	G	1,47E-14	-	-	++
	SM100	1,64E+08	1,64E+08	124842	0	7	G	1,15E-16	-	-	++

### Cont/ Tabela 13

Região Cromossômica	Casos	Start	End	Tamanho (pb)	Grupo Controle	Nº de Sondas	Evento	P valor	Genes	MicroRNA	Presença de CNVs
3q29	SM34	1,99E+08	1,99E+08	528557	0	37	P	5,97E-95	<i>BDH1, BDH1, BDH1, LOC220729, KIAA0226, KIAA0226, FYTDD1, LRCH3</i>	hsa-mir-922	++
4p16.3	SM47	663477	1721606	1058129	0	79	G	1,73E-28	<i>MYL5, MFSD7, PCGF3, CPLX1, GAK, TMEM175, DGKQ, SLC26A1, IDUA, SLC26A1, SLC26A1, FGFRL1, FGFRL1, FGFRL1, RNF212, SPON2, SPON2, LOC100130872, CTBP1, C4orf42, MAEA, KIAA1530, CRIPAK, FAM53A, SLBP, TMEM129, TACC3</i>	-	++
4p16.3	SM87	61352	107546	46194	0	4	G	2,27E-15	<i>ZNF595, ZNF718</i>	-	++
4q22.2 - q35.2	SM100	94533109	1,91E+08	96494907	0	4905	G	0	Vários	Vários	++
4q27 - q28.1	MT5	1,24E+08	1,24E+08	475493	0	41	G	1,29E-31	<i>FGF2, NUDT6, SPATA5</i>	-	+
4q31.22	SM37	1,45E+08	1,45E+08	135218	0	5	P	1,65E-18	<i>GYPB</i>	-	++
4q32.2	SM63	1,62E+08	1,62E+08	58732	0	4	G	7,64E-17	-	-	++
4q34.1	SM87	1,74E+08	1,74E+08	18925	0	3	G	2,09E-12	<i>GALNTL6</i>	-	+
4q35.2	SM101	1,91E+08	1,91E+08	36474	0	3	G	4,67E-15	-	-	++
4q35.2	SM19	1,9E+08	1,91E+08	899970	0	50	G	5,10E-67	-	-	++
5p15.2	SM12	12645163	12722931	77768	0	4	P	8,62E-13	-	-	+
6p11.2	SM87	57377759	57598026	220267	0	19	G	5,25E-18	<i>PRIM2</i>	-	++
6p11.2	SM88	57385552	57598026	212474	0	18	G	3,89E-16	<i>PRIM2</i>	-	++
6p21.33	SM6	29962649	29982112	19463	1%	3	P	1,71E-15	<i>HLA-H, HCG2P7</i>	-	++
	MT39	29962649	29982112	19463	1%	3	P	4,00E-29	<i>HLA-H, HCG2P7</i>	-	++
	SL55	29962649	29982112	19463	1%	3	P	6,14E-35	<i>HLA-H, HCG2P7</i>	-	++
6p21.33	SM88	29950605	30004836	54231	0	6	P	1,69E-17	<i>HLA-H, HCG2P7, HCG4P6</i>	-	++
6p25.3	SM100	129579	455857	326278	0	24	G	5,58E-17	<i>DUSP22, IRF4, EXOC2</i>	-	++

**Cont/ Tabela 13**

Região Cromossômica	Casos	Start	End	Tamanho (pb)	Grupo Controle	Nº de Sondas	Evento	P valor	Genes	MicroRNA	Presença de CNVs
6q12	SM34	65552358	65828618	276260	0	18	P	3,27E-41	<i>EYS</i>	-	+
6q27	SM33	1,68E+08	1,68E+08	242800	0	16	G	1,12E-28	<i>MLLT4, HGC6.3, KIF25, FRMD1</i>	-	++
7p12.1	MT5	53428317	53550819	122502	1%	7	P	6,03E-17	-	-	++
7p22.2	SM12	4325467	4494595	169128	0	8	P	8,02E-26	-	-	++
7p22.3	SL16	1234712	1264286	29574	0	3	G	2,13E-22	<i>UNCX</i>	-	++
7q21.13	SM12	89582137	90167047	584910	0	45	G	4,78E-63	<i>DPY19L2P4, STEAP1, STEAP2, STEAP2, STEAP2, C7orf63, GTPBP10, CLDN12</i>	-	++
7q31.31	SM87	1,2E+08	1,2E+08	127990	0	12	G	1,17E-15	<i>ING3, C7orf58</i>	-	+
8p11.23	SL16	39356395	39378251	21856	0	3	P	4,36E-28	<i>ADAM5P</i>	-	++
8p11.23	SM33	39356395	39464777	108382	1%	10	G	4,66E-19	<i>ADAM5P, ADAM3A</i>	-	++
	SM63	39356395	39464777	108382	1%	10	G	6,46E-51	<i>ADAM5P, ADAM3A</i>	-	++
8p11.23 - p11.22	SM7	39356395	39511832	155437	0	13	P	7,59E-15	<i>ADAM5P, ADAM3A</i>	-	++
8p23.2	SM7	2337083	2546879	209796	0	10	P	7,52E-42	-	-	++
8p23.3	SM100	897434	964825	67391	0	4	P	1,31E-19	-	-	++
9p23	SM150	12153030	12239707	86677	0	4	P	5,00E-15	-	-	++
9p23	SM63	11942322	12104438	162116	0	6	P	8,50E-28	-	-	++
10p15.3	SL154	1204016	1706887	502871	0	38	P	1,52E-21	<i>ADARB2, NCRNA00168</i>	-	+
10q11.21	SM150	44567491	44669960	102469	1%	6	G	6,31E-16	-	-	++
10q11.22	MT39	46395963	47172734	776771	1%	24	P	2,59E-20	<i>GPRIN2, PPYR1, LOC728643, ANXA8, ANXA8L1, FAM25C, FAM25G, FAM25B, LOC642826, ANTXRL</i>	-	++
10q11.22	SM37	46395963	46568696	172733	1%	14	P	9,20E-33	<i>GPRIN2, PPYR1, LOC728643</i>	-	++
10q26.3	SM88	1,35E+08	1,35E+08	123834	1%	11	P	8,45E-35	<i>LOC619207, CYP2E1, SYCE1, SYCE1, SYCE1</i>	-	++
11p15.5	SM47	1941455	1993369	51914	0	8	G	3,76E-14	<i>LOC100133545, H19</i>	hsa-mir-675	++

**Cont/ Tabela 13**

Região Cromossômica	Casos	Start	End	Tamanho (pb)	Grupo Controle	Nº de Sondas	Evento	P valor	Genes	MicroRNA	Presença de CNVs
11q11	SM100	55157878	55187482	29604	0	4	P	3,20E-13	OR4P4, OR4S2	-	++
11q11	SM7	55141993	55207505	65512	0	7	G	2,22E-16	OR4P4, OR4S2, OR4C6	-	++
	SM150	55141993	55207505	65512	0	7	G	2,15E-16	OR4P4, OR4S2, OR4C6	-	++
12p13.31	SM33	9528390	9589925	61535	1%	6	G	2,93E-15	-	-	++
12q24.33	SM87	1,3E+08	1,3E+08	82383	0	6	P	1,09E-37	-	-	++
13q21.1	SM63	56610686	56691555	80869	0	5	P	1,42E-25	PRR20, LOC729233, LOC729240, LOC729246, LOC729250, LOC729240, PRR20, LOC729233, LOC729246, LOC729250, LOC729240, LOC729233, PRR20, LOC729246, LOC729250, PRR20, LOC729233, LOC729240, LOC729246, LOC729250	-	++
13q21.32	SM34	64630281	64779577	149296	0	6	P	3,85E-16	-	-	+
13q31.1	SM47	83920574	83973495	52921	0	4	G	4,34E-14	-	-	+
14q11.2	SM7	19286928	19484213	197285	0	11	G	1,59E-16	OR4M1, OR4N2, OR4K2, OR4K5, OR4K1	-	++
14q24.3	SM59	73060101	73092218	32117	0	4	P	4,36E-14	HEATR4, ACOT1	-	++
14q32.33	SL24	1,06E+08	1,06E+08	40274	1%	5	P	3,60E-20	-	-	++
14q32.33	SM100	1,06E+08	1,06E+08	246133	1%	18	P	9,83E-58	-	-	++
14q32.33	SM100	1,06E+08	1,06E+08	455283	0	38	G	1,66E-21	LOC100133469	-	++
14q32.33	SM47	1,04E+08	1,04E+08	17416	0	4	G	7,57E-15	ASPG	-	+
15q11.2	MT16	18450362	19882911	1432549	0	32	G	8,83E-59	LOC727832, GOLGA8C, LOC646214, CXADRP2, POTE, LOC727924, OR4M2	-	++
15q11.2	MT39	18741516	20317192	1575676	0	47	P	2,61E-27	LOC727832, GOLGA8C, LOC646214, CXADRP2, POTE, LOC727924, OR4M2, OR4N4, LOC650137, GOLGA8D, LOC283767	hsa-mir-1268	++

**Cont/ Tabela 13**

Região Cromossômica	Casos	Start	End	Tamanho (pb)	Grupo Controle	Nº de Sondas	Evento	P valor	Genes	MicroRNA	Presença de CNVs
15q11.2	MT67	18450362	20060261	1609899	1%	48	G	1,26E-33	LOC727832, GOLGA8C, LOC646214, CXADRP2, POTEb, LOC727924, OR4M2, OR4N4, LOC650137	hsa-mir-1268	++
	SL154	18450362	20060261	1609899	1%	48	G	2,72E-74	LOC727832, GOLGA8C, LOC646214, CXADRP2, POTEb, LOC727924, OR4M2, OR4N4, LOC650137	hsa-mir-1268	++
15q11.2	SM12	18741516	19882911	1141395	0	30	G	2,59E-39	LOC727832, GOLGA8C, LOC646214, CXADRP2, POTEb, LOC727924, OR4M2	-	++
15q11.2	SM33	18862856	20336087	1473231	0	44	G	7,22E-106	LOC727832, GOLGA8C, LOC646214, CXADRP2, POTEb, LOC727924, OR4M2, OR4N4, LOC650137, GOLGA8D, LOC283767	hsa-mir-1268	++
15q11.2	SM67	18692665	19882911	1190246	1%	31	G	2,32E-80	LOC727832, GOLGA8C, LOC646214, CXADRP2, POTEb, LOC727924, OR4M2	-	++
15q11.2	SM87	18692665	20336087	1643422	0	49	G	3,40E-67	LOC727832, GOLGA8C, LOC646214, CXADRP2, POTEb, LOC727924, OR4M2, OR4N4, LOC650137, GOLGA8D, LOC283767	hsa-mir-1268	++
15q11.2	SM88	19146396	20366870	1220474	0	40	G	4,64E-21	LOC646214, CXADRP2, POTEb, LOC727924, OR4M2, OR4N4, LOC650137, GOLGA8D, LOC283767	hsa-mir-1268	++
15q21.3	SM33	54484950	54513771	28821	0	5	G	2,74E-14	TEX9, MNS1	-	++
16p11.2	MT28	32481109	33559407	1078298	1%	19	G	6,54E-15	LOC729355, TP53TG3, SLC6A10P, LOC729355, TP53TG3, LOC729355, TP53TG3	-	++

Cont/ Tabela 13

Região Cromossômica	Casos	Start	End	Tamanho (pb)	Grupo Controle	Nº de Sondas	Evento	P valor	Genes	MicroRNA	Presença de CNVs
16p11.2	SM47	29238604	30104991	866387	0	48	G	5,53E-31	RUNDC2C, LOC606724, BOLA2, BOLA2B, GIYD1, GIYD2, SULT1A3, SULT1A4, SULT1A3, SULT1A4, LOC388242, LOC613038, LOC440354, SLC7A5P1, SPN, SPN, QPRT, C16orf54, MAZ, PRRT2, C16orf53, MVP, MVP, CDIPT, LOC440356, LOC440356, SEZ6L2, ASPHD1, KCTD13, TMEM219, TAOK2, TAOK2, HIRIP3, INO80E, DOC2A, C16orf92, FAM57B, ALDOA, ALDOA, ALDOA, ALDOA, PPP4C, TBX6, YPEL3, YPEL3, GDPD3, MAPK3, LOC100271831, CORO1A	-	++
16p11.2 - p11.1	SM87	34309887	34584993	275106	0	10	G	1,49E-14	LOC283914, LOC283914, LOC146481	-	++
16p13.3	SM47	447079	1440204	993125	0	84	G	2,14E-31	RAB11FIP3, RAB11FIP3, C16orf10, SOLH, C16orf11, FLJ36208, PIGQ, PIGQ, RAB40C, WFIKKN1, C16orf13, C16orf14, WDR90, RHOT2, RHBDL1, STUB1, JMJD8, WDR24, FBXL16, METRN, FAM173A, CCDC78, HAGHL, HAGHL, NARFL, MSLN, MSLNL, RPUSD1, CHTF18, GNG13, LOC388199, LMF1, SOX8, LOC146336, SSTR5, C1QTNF8, CACNA1H, TPSG1, TPSB2, TPSAB1, TPSD1, LOC100130430, UBE2I, UBE2I, UBE2I, BAIAP3, C16orf42, GNPTG, UNKL, UNKL, C16orf91, CCDC154, CLCN7	hsa-mir-662	++
16q22.3	MT67	72929586	72964983	35397	1%	4	P	7,59E-13	LOC283922	-	++
17q21.31	SL154	41553026	41653061	100035	0	9	G	3,39E-15	KIAA1267	-	++

**Cont/ Tabela 13**

Região Cromossômica	Casos	Start	End	Tamanho (pb)	Grupo Controle	Nº de Sondas	Evento	P valor	Genes	MicroRNA	Presença de CNVs
17q25.3	SM47	76680753	77053383	372630	0	33	G	2,38E-23	<i>BAIAP2, BAIAP2, BAIAP2, AATK, LOC388428, AZI1, C17orf56, C17orf89, SLC38A10, SLC38A10, C17orf55, TMEM105, BAHCC1</i>	hsa-mir-657, hsa-mir-338, hsa-mir-1250	++
18p11.32	SL154	1909485	1970987	61502	0	5	P	2,76E-13	-	-	++
20p12.1	MT67	14746898	14832929	86031	0	8	P	1,52E-15	<i>MACROD2</i>	-	++
20p12.3	SM34	8163519	8216565	53046	0	4	P	2,97E-12	<i>PLCB1</i>	-	++
20p13	SM64	69321	124381	55060	0	5	P	8,83E-31	<i>DEFB126, DEFB127, DEFB128</i>	-	+
22q13.1	SM47	38315615	38389382	73767	0	7	G	2,34E-25	<i>CACNA1I</i>	-	+

P: perda genômica; G: ganho genômico; - ausente; + ≤3 CNVs descritas no DGV; ++ mais de 3 CNVs descritas no DGV.

**Tabela 14** - Alterações novas raras comuns aos grupos 1 e 2 ou exclusivas de cada grupo.

**CNVs Novas Raras Comuns G1 e G2**

Região Cromossômica	Casos	Start	End	Tamanho (pb)	Nº de Sondas	Evento	P valor	Genes	MicroRNA
14q23.1	SM83 (G1)	60588068	60606107	18039	3	G	3,54E-13	<i>SLC38A6</i>	-
	SM173 (G1)	60588068	60606107	18039	3	G	4,27E-15	<i>SLC38A6</i>	-
	LFS144 (G2)	60588068	60606107	18039	3	G	7,19E-16	<i>SLC38A6</i>	-
3p12.3	SM37 (G2)	78990568	79028038	37470	4	P	1,19E-18	<i>ROBO1</i>	-
	SM56 (G1)	78990568	79028038	37470	4	P	5,29E-14	<i>ROBO1</i>	-
11p11.2	SM87 (G2)	46965179	46988641	23462	3	G	2,01E-13	<i>C11orf49</i>	-
	SM88 (G2)	46965179	46988641	23462	3	G	6,87E-13	<i>C11orf49</i>	-
	SM98 (G1)	46965179	46988641	23462	3	G	1,08E-13	<i>C11orf49</i>	-

**CNVs Novas Raras Exclusivas G1**

Região Cromossômica	Casos	Start	End	Tamanho (pb)	Nº de Sondas	Evento	P valor	Genes	MicroRNA
4q12	SM98	56785476	56809225	23749	3	G	5,32E-13	<i>KIAA1211</i>	-
6q24.3	VCS	146324451	146392895	68444	4	G	1,31E-13	<i>SHPRH, GRM1</i>	-
7p22.2	SM26	2513093	2536948	23855	3	G	1,32E-12	<i>LFNG</i>	-
7p22.2	VCS	2106885	2127052	20167	3	G	1,93E-16	<i>MAD1L1</i>	-
14q32.11	SM98	89113111	89136415	23304	3	G	3,80E-12	<i>FOXN3, PRO1768</i>	-
19q13.32	VCS	52220023	52266884	46861	4	G	4,03E-14	<i>NPAS1, TMEM160, ZC3H4</i>	-
21q22.3	SM26	45195687	45218964	23277	3	G	7,76E-13	<i>C21orf70</i>	-
21q22.3	SM173	42682926	42756744	73818	8	G	6,18E-16	<i>TMPRSS3, UBASH3A</i>	-

**Cont/ Tabela 14**

**CNVs Novas Raras Exclusivas G2**

Região Cromossômica	Casos	Start	End	Tamanho (pb)	Nº de Sondas	Evento	P valor	Genes	MicroRNA
1q23.3	SM150	162030664	162091051	60387	5	P	1,66E-15	-	-
1q31.2	SM63	191625780	191727377	101597	3	P	9,18E-16	-	-
3p14.1	SM87	71124097	71233818	109721	9	G	6,46E-13	<i>FOXP1</i>	-
5p15.2	SM88	12752465	12787290	34825	3	P	1,17E-14	-	-
5q11.2	SM88	55603156	55657043	53887	5	G	5,95E-14	-	-
6p22.1	SM77	29201691	29260945	59254	6	P	3,31E-14	<i>OR2J2</i>	-
7p22.3	SL16	996692	1047907	51215	8	G	4,00E-14	<i>C7orf50</i>	hsa-mir-339
7q36.3	SM6	158001395	158021351	19956	5	P	1,25E-26	<i>PTPRN2</i>	hsa-mir-595
13q14.3	SM37	49039910	49062297	22387	5	G	1,02E-20	<i>RCBTB1</i>	-
15q26.1	SM87	89111000	89147948	36948	5	G	3,70E-12	<i>BLM</i>	-
16q21	SM7	61782647	61890318	107671	5	P	6,82E-20	-	-
17q25.1	SM87	71478161	71511523	33362	3	G	8,68E-15	<i>ACOX1, LOC100134934, CDK3</i>	-
Xq13.1	SM87	71348690	71391442	42752	3	G	5,41E-14	<i>ERCC6L</i>	-

P: perda genômica; G: ganho genômico; - ausente

Como descrito no item 3.2.3 da seção Material e Métodos, todas as alterações geradas pelo software *DNA Analytics* (Agilent Technologies) foram baseadas no banco de dados Hg18 (NCBI Build 36, March 2006). No grupo 1, 13 CNVs raras não apresentavam genes descritos e duas CNVs novas raras não apresentavam genes caracterizados. No grupo 2, 30 CNVs raras e cinco novas raras não apresentavam genes descritos. Além disso, uma CNV rara e duas novas raras não apresentavam genes caracterizados. Com o intuito de confirmar a ausência de genes conhecidos nessas regiões cromossômicas, as sequências de *start* e *end* de cada uma dessas alterações foram pesquisadas no banco de dados UCSC Hg19 (NCBI Build 37, February 2009). Dessa maneira, verificou-se que no grupo 1, 3/13 alterações raras apresentavam genes descritos, e no grupo 2, 10/30 alterações raras e 1/5 novas raras, apresentavam genes descritos (Tabela 15).

**Tabela 15** - Alterações com genes descritos utilizando o Hg19 (NCBI Build 37, February 2009).

<b>Novas Raras</b>							
Região Cromossômica	Casos	Grupo	Start	Stop	Tamanho (pb)	Evento	Genes
5p15.2	SM88	G2	12752465	12787290	34825	P	TAG
<b>Raras</b>							
Região Cromossômica	Casos	Grupo	Start	Stop	Tamanho (pb)	Evento	Genes
2q32.1	SM47	G2	186064414	186277467	213053	P	DD413621
2q37.3	SM173	G1	242572531	242596854	24323	P	AK097934, BC101234
3q26.1	SL167	G1	164023302	164101976	78674	G	BC073807
3q26.1	SM64	G2	163977134	164101976	124842	G	BC073807
	SM100	G2	163977134	164101976	124842	G	BC073807
5p15.2	SM12	G2	12645163	12722931	77768	P	TAG
8p23.2	SM7	G2	2337083	2546879	209796	P	BC045738
8p23.3	SM100	G2	897434	964825	67391	P	BC022082, BC038783
10q11.21	SM150	G2	44567491	44669960	102469	G	TMEM72-AS1
11q25	SL155	G1	133858824	134217023	358199	G	LOC283177, AK095081, AK125040
11q25	SM19	G2	133858824	134217023	358199	G	LOC283177, AK095081, AK125040
12q24.33	SM87	G2	130299107	130381490	82383	P	BC042649
14q32.33	SM100	G2	105602402	105848535	246133	P	BC042994, LINC00226

Como as CNVs novas raras não foram identificadas no grupo de referência e nem no banco de dados do DGV, elas serão detalhadamente apresentadas. As CNVs novas raras sem genes conhecidos (1q23.3, 1q31.2, 5p15.2, 5q11.2 e 16q21) ou caracterizados (C11orf49, C21orf70, C7orf50) no banco de dados UCSC Hg18 (NCBI Build 36, March 2006), não serão detalhadas, porém poderão ser alvo de estudos futuros. Apesar dessas regiões terem sido avaliadas no Hg19 e ter sido observados genes nessas regiões, eles não codificam proteínas.

Os genes mapeados nas alterações cromossômicas novas raras foram avaliados quanto às suas funções, utilizando o banco de dados EASE

(<http://david.niaid.nih.gov/david/ease.htm>) (Tabela 16). Na Tabela 17 foram descritos os dados das sequências genômicas alteradas, como nome do gene mapeado nessa região, referência de localização (*start* e *end*), tamanho da alteração em pares de base (pb), número de sondas presentes na lâmina de acordo com as informações do fabricante (Agilent Technologies), número de sondas alteradas de acordo com o software *DNA Analytics* (Agilent Technologies) e localização dessas sondas nos genes.

**Tabela 16** - Funções dos genes mapeados nas CNVs novas raras, geradas pelo software *DNA Analytics*.

<b>CNVs Novas Raras Comuns G1 e G2</b>				
<b>Região Cromossômica</b>	<b>Casos</b>	<b>Evento</b>	<b>Genes</b>	<b>Função gênica</b>
3p12.3	<b>G1:</b> SM56 <b>G2:</b> SM37	P	<i>ROBO1</i>	Estrutura celular, motilidade e transporte; crescimento, desenvolvimento e manutenção celular; comunicação celular
14q23.1	<b>G1:</b> SM83, SM173 <b>G2:</b> LFS144	G	<i>SLC38A6</i>	Estrutura celular, motilidade e transporte; metabolismo celular; crescimento, desenvolvimento e manutenção celular
<b>CNVs Novas Raras Exclusivas G1</b>				
<b>Região Cromossômica</b>	<b>Casos</b>	<b>Evento</b>	<b>Genes</b>	<b>Função gênica</b>
4q12	SM98	G	<i>KIAA1211</i>	Metabolismo celular
7p22.2	VCS	G	<i>MAD1L1</i>	Crescimento, desenvolvimento e manutenção celular
14q32.11	SM98	G	<i>FOXN3</i> <i>PRO1768</i>	Metabolismo celular -
<b>CNVs Novas Raras Exclusivas G2</b>				
<b>Região Cromossômica</b>	<b>Casos</b>	<b>Evento</b>	<b>Genes</b>	<b>Função gênica</b>
3p14.1	SM87	G	<i>FOXP1</i>	Metabolismo celular
7q36.3*	SM6	P	<i>PTPRN2</i>	Metabolismo celular
13q14.3	SM37	G	<i>RCBTB1</i>	Crescimento, desenvolvimento e manutenção celular
15q26.1	SM87	G	<i>BLM</i>	Metabolismo celular; crescimento, desenvolvimento e manutenção celular; comunicação celular
17q25.1	SM87	G	<i>ACOX1</i> <i>LOC100134934</i> <i>CDK3</i>	Estrutura celular, motilidade e transporte; metabolismo celular - Estrutura celular, motilidade e transporte; metabolismo celular; crescimento, desenvolvimento e manutenção celular

**Legenda.** \* região cromossômica com microRNA (7q36.3: hsa-mir-595); P: perda genômica; G: ganho genômico; - não foram identificados.

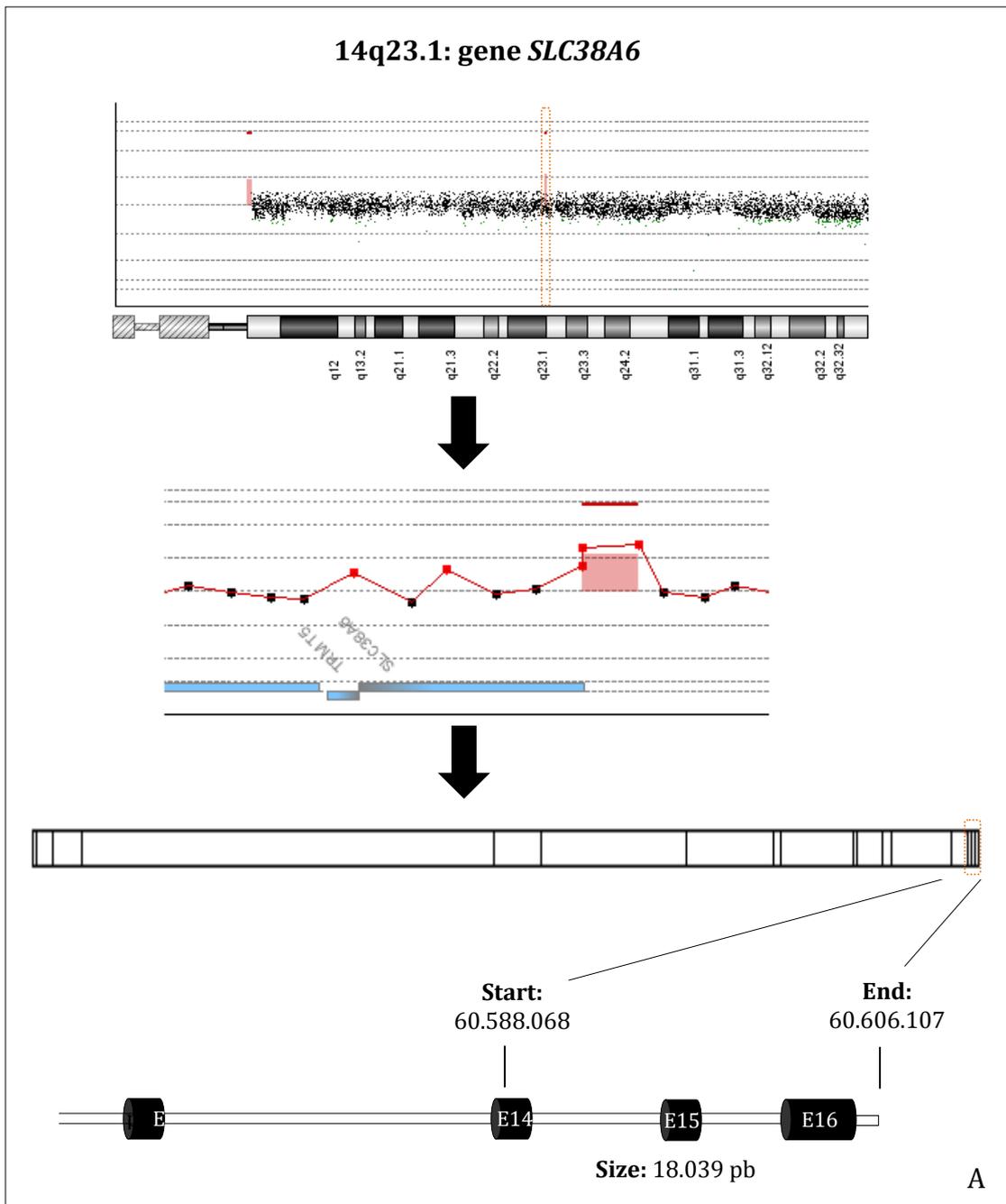
**Tabela 17** - Base de dados das sequências genômicas de acordo com as CNVs novas raras detectadas.

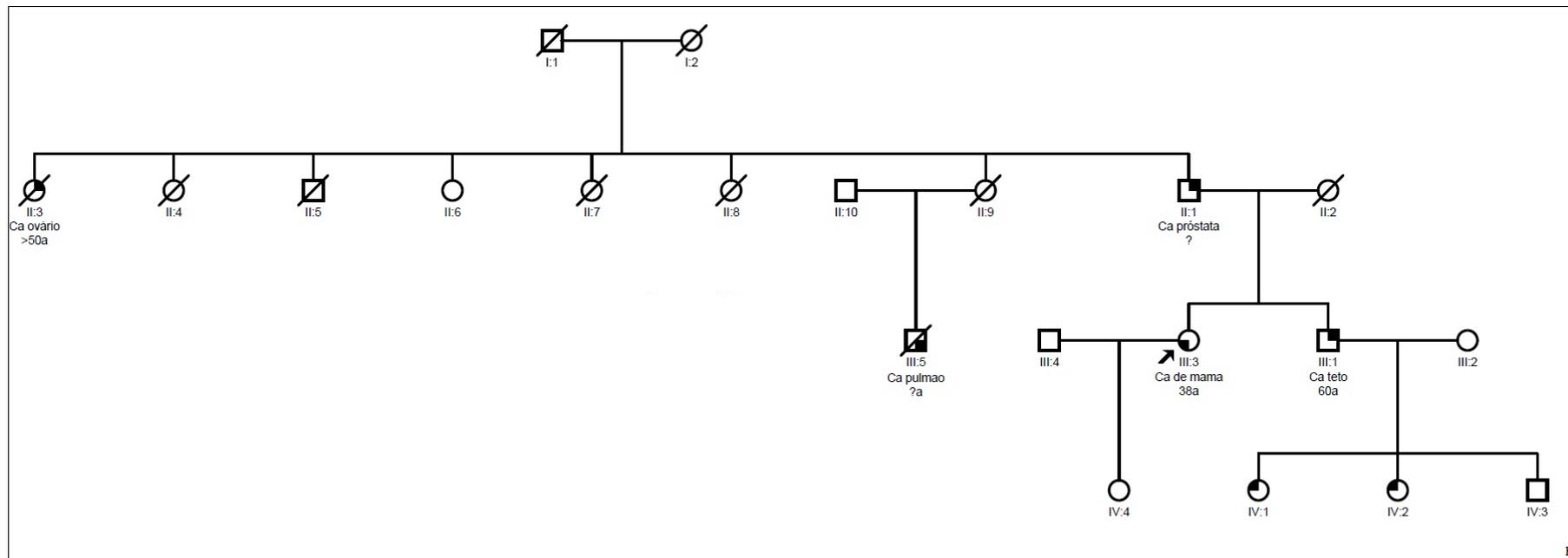
<b>CNVs Comuns G1 e G2</b>									
<b>Região Cromossômica</b>	<b>Casos</b>	<b>Start</b>	<b>End</b>	<b>Tamanho (pb)</b>	<b>Evento</b>	<b>Genes</b>	<b>Sondas na lâmina</b>	<b>Sondas alteradas</b>	<b>Localização da sonda no gene</b>
3p12.3	G1: SM56 G2: SM37	78990568	79028038	37470	P	<i>ROBO1</i>	76	4	I4-5
14q23.1	G1: SM83, SM173 G2: LFS144	60588068	60606107	18039	G	<i>SLC38A6</i>	6	2	E14 ao E16
<b>CNVs Exclusivas G1</b>									
<b>Região Cromossômica</b>	<b>Casos</b>	<b>Start</b>	<b>End</b>	<b>Tamanho (pb)</b>	<b>Evento</b>	<b>Genes</b>	<b>Sondas na lâmina</b>	<b>Sondas alteradas</b>	<b>Localização da sonda no gene</b>
4q12	SM98	56785476	56809225	23749	G	<i>KIAA1211</i>	13	3	I2-3
7p22.2	VCS	2106885	2127052	20167	G	<i>MAD1L1</i>	32	3	I11-12
14q32.11	SM98	89113111	89136415	23304	G	<i>FOXN3</i>	17	3	I1-2
<b>CNVs Exclusivas G2</b>									
<b>Região Cromossômica</b>	<b>Casos</b>	<b>Start</b>	<b>End</b>	<b>Tamanho (pb)</b>	<b>Evento</b>	<b>Genes</b>	<b>Sondas na lâmina</b>	<b>Sondas alteradas</b>	<b>Localização da sonda no gene</b>
3p14.1	SM87	71124097	71233818	109721	G	<i>FOXP1</i>	59	9	I6-7 ao I12-13
7q36.3*	SM6	158001395	158021351	19956	P	<i>PTPRN2</i>	91	5	I1-2
13q14.3	SM37	49039910	49062297	22387	G	<i>RCBTB1</i>	12	3	I1-2 ao I2-3
15q26.1	SM87	89111000	89147948	36948	G	<i>BLM</i>	9	5	I9-10 ao I18-19
17q25.1	SM87	71478161	71511523	33362	G	<i>ACOX1</i>	4	1	I2-3 ( <i>CDK3</i> ) ao I2-3 ( <i>ACOX1</i> )
						<i>LOC100134934</i>	1	1	
						<i>CDK3</i>	1	1	

**Legenda.** \* região cromossômica com microRNA (7q36.3: hsa-mir-595); P: perda genômica; G: ganho genômico; I: íntron; E: éxon.

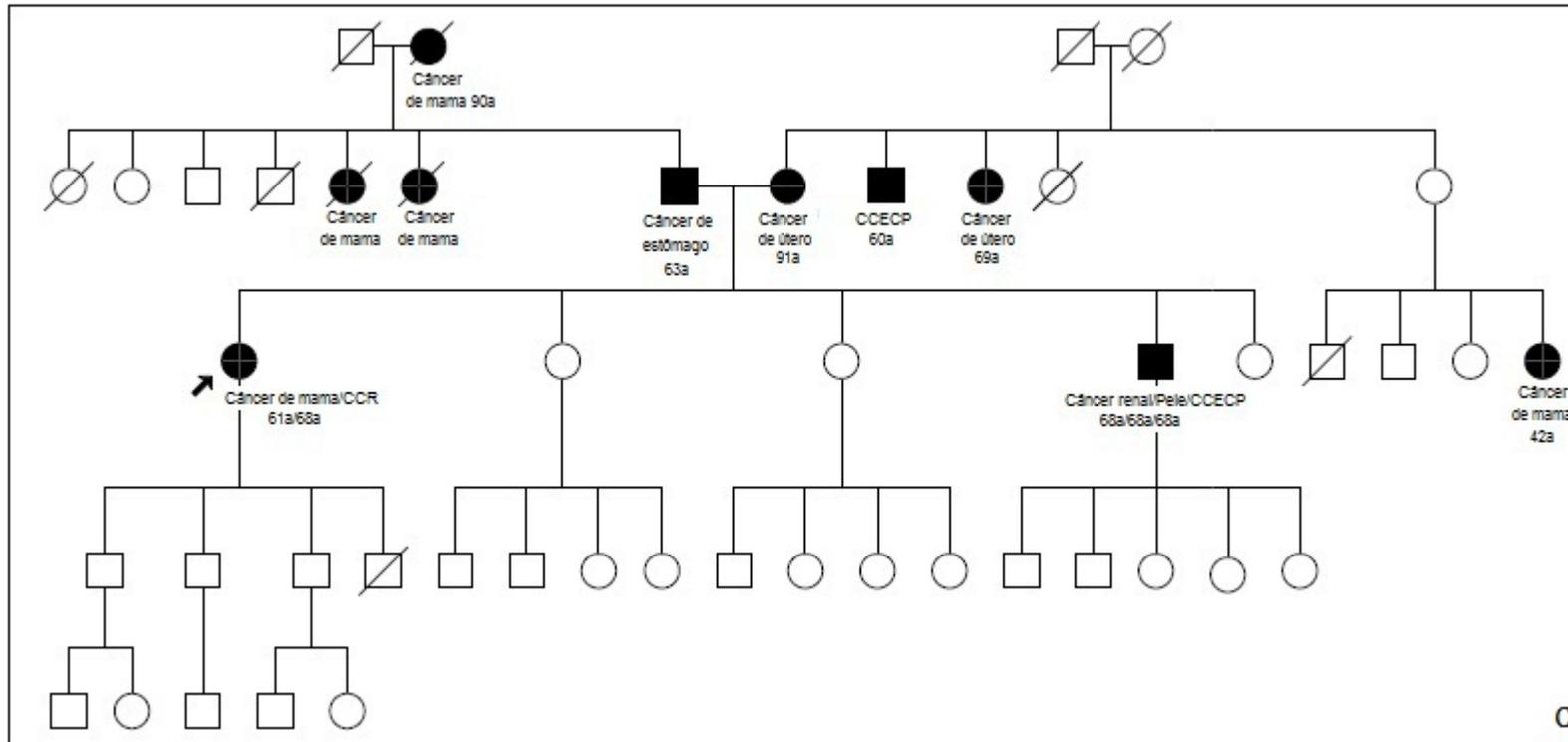
Entre as CNVs novas raras comuns aos grupos 1 e 2, foram identificadas duas alterações envolvendo os genes *ROBO1* e *SLC38A6*, mapeados em 3p12.3 e 14q23.1, respectivamente. A perda genômica envolvendo o gene *ROBO1*, será detalhada no item 4.3 desta seção.

O ganho na região 14q23.1, envolvendo o gene *SLC38A6* foi observado nos casos SM83 e SM173 (ambos do grupo 1) e LFS144 (grupo 2). O tamanho da alteração (18.039 pb) e as sequências alteradas, do éxon 14 ao éxon 16, também foram idênticas em todos os casos. A plataforma da Agilent (4x180K), possui seis sondas para o gene *SLC38A6* sendo duas delas envolvidas em ganhos (Figura 10). Um familiar da paciente SM83 concordou em participar deste estudo, porém as alterações identificadas nessa família serão apresentadas no item 4.2.3 desta seção.





B



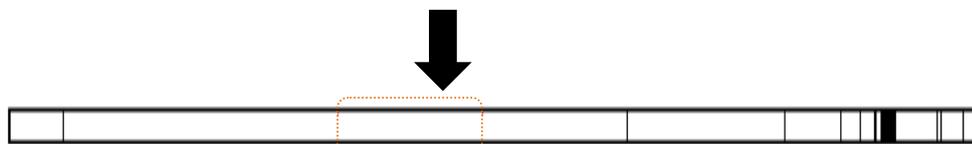
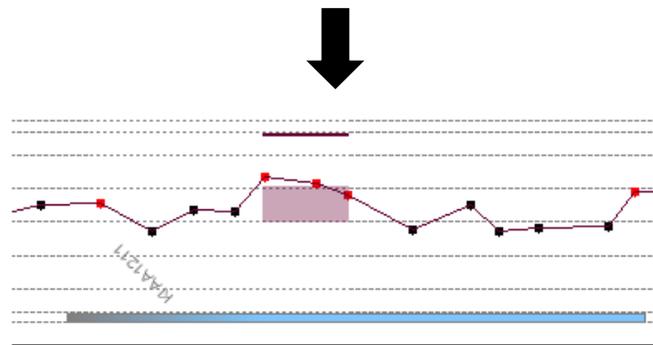
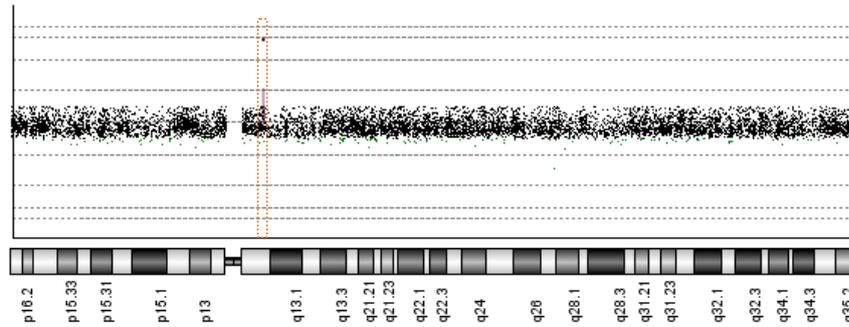
**Figura 10** - Representação esquemática do ganho envolvendo o gene *SLC38A6* mapeado em 14q23.1 e os heredogramas das pacientes com essa alteração. **A.** Ganho envolvendo o gene *SLC38A6*. **B.** Heredograma do caso SM173. A probanda do estudo, SM173 (III:3) desenvolveu câncer de mama aos 38 anos. **C.** Heredograma do caso LFS144. A paciente LFS144 (seta) apresentou câncer de mama e CCR aos 61 e 68 anos, respectivamente. Ca: câncer; a: idade em anos.

Entre as CNVs novas raras exclusivas do grupo 1, foram identificadas quatro alterações envolvendo os genes *KIAA1211* (mapeado em 4q12), *MAD1L1* (mapeado em 7p22.2), *FOXN3* (mapeado em 14q32.11), *TMPRSS3* e *UBASH3A* (ambos mapeados em 21q22.3).

O caso SM98 apresentou um total de 18 CNVs, sendo duas delas novas raras envolvidas em ganhos genômicos e englobando os genes *KIAA1211* e *FOXN3*. A plataforma 4x180K possui 13 sondas para o gene *KIAA1211* e 17 para o gene *FOXN3*. A alteração envolvendo o gene *KIAA1211* estava localizada no íntron 2-3 e envolveu 23.749 pb (Figura 11A). O ganho no gene *FOXN3* envolveu 23.304 pb e estava mapeada no íntron 1-2 (Figura 11B).

O ganho envolvendo o gene *MAD1L1*, mapeado em 7p22.2, foi identificado na paciente VCS, a qual apresentou um total de 18 CNVs. O gene identificado na alteração possui 32 sondas mapeadas na plataforma, porém apenas três, localizadas no íntron 11-12, estavam envolvidas em ganho genômico. O tamanho da alteração foi 20.167 pb (Figura 12A).

### 4q12: gene *KIAA1211*



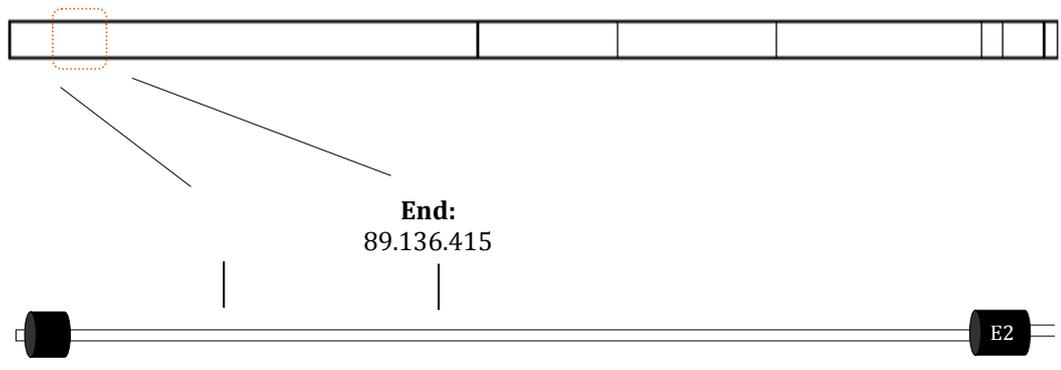
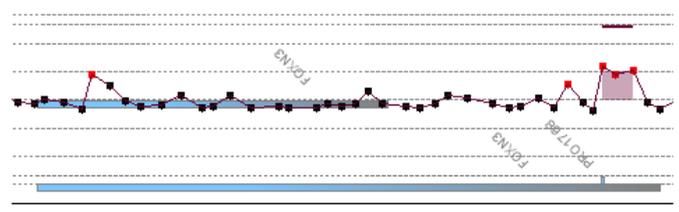
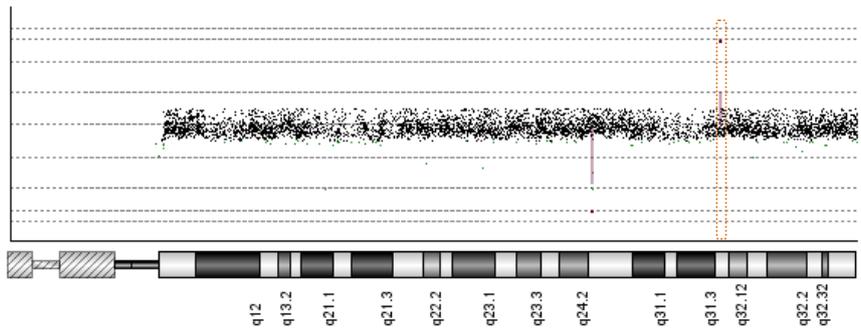
**Start:**  
56.785.476

**End:**  
56.809.225

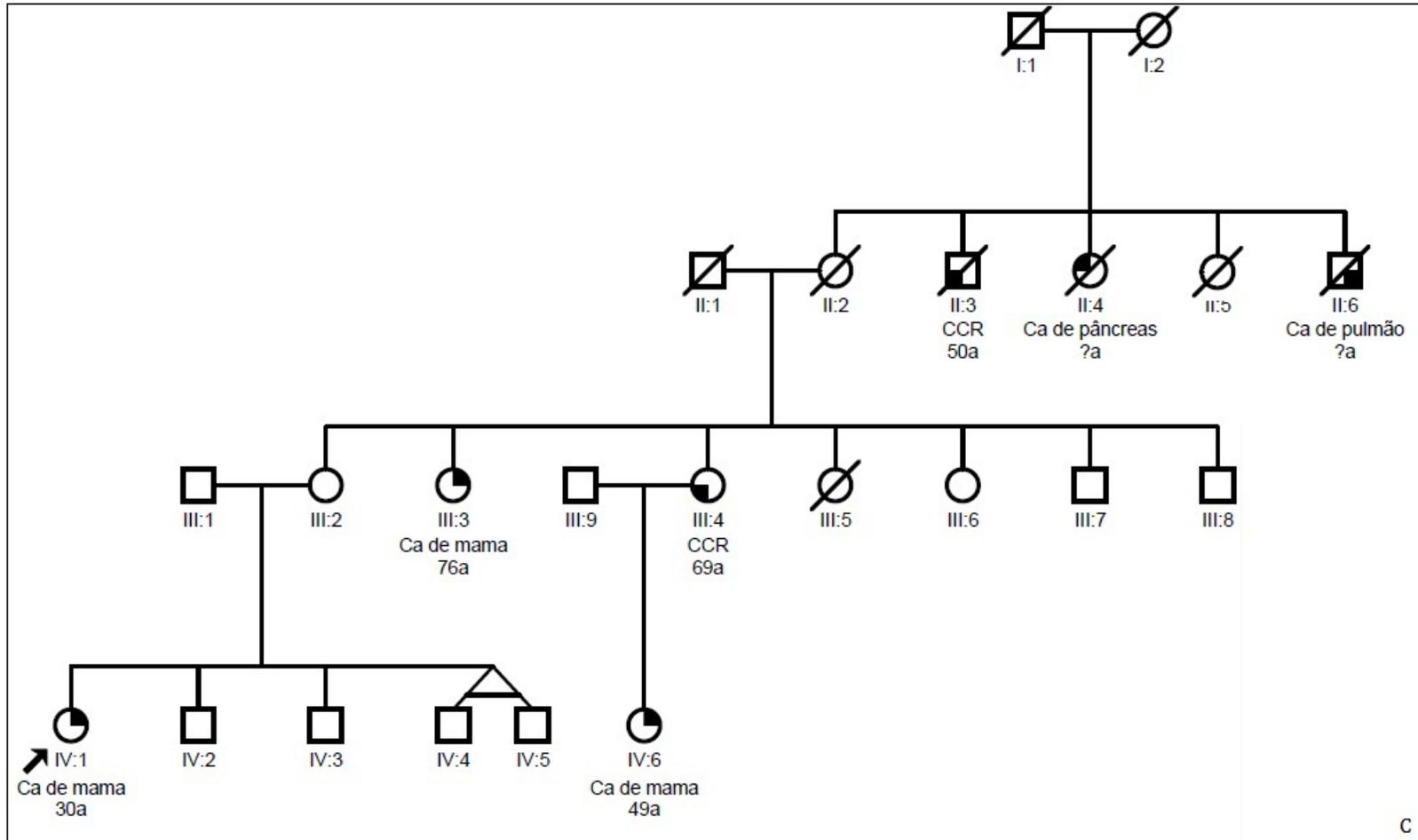


A

### 14q32.11: gene *FOXN3*

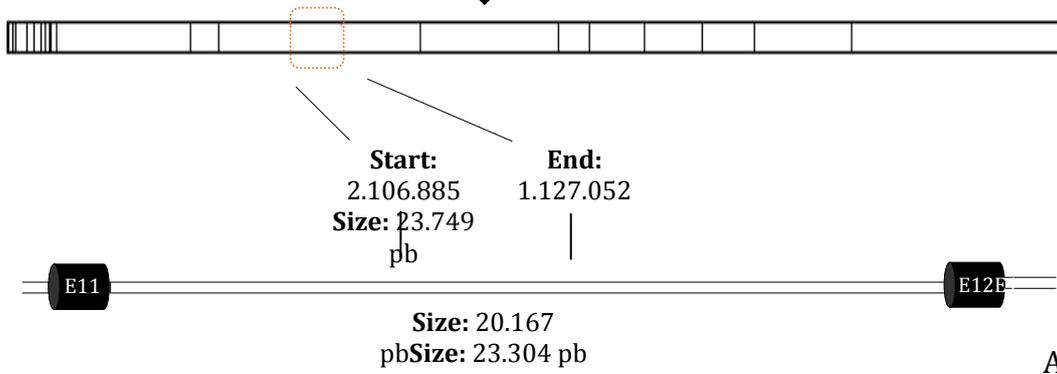
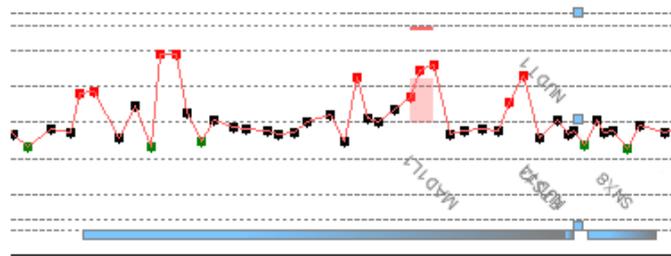
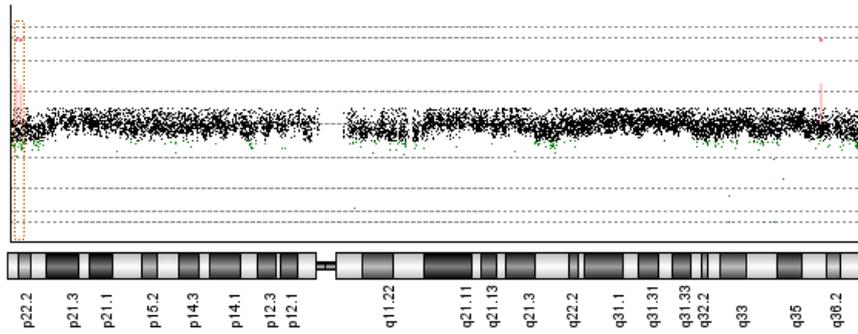


B

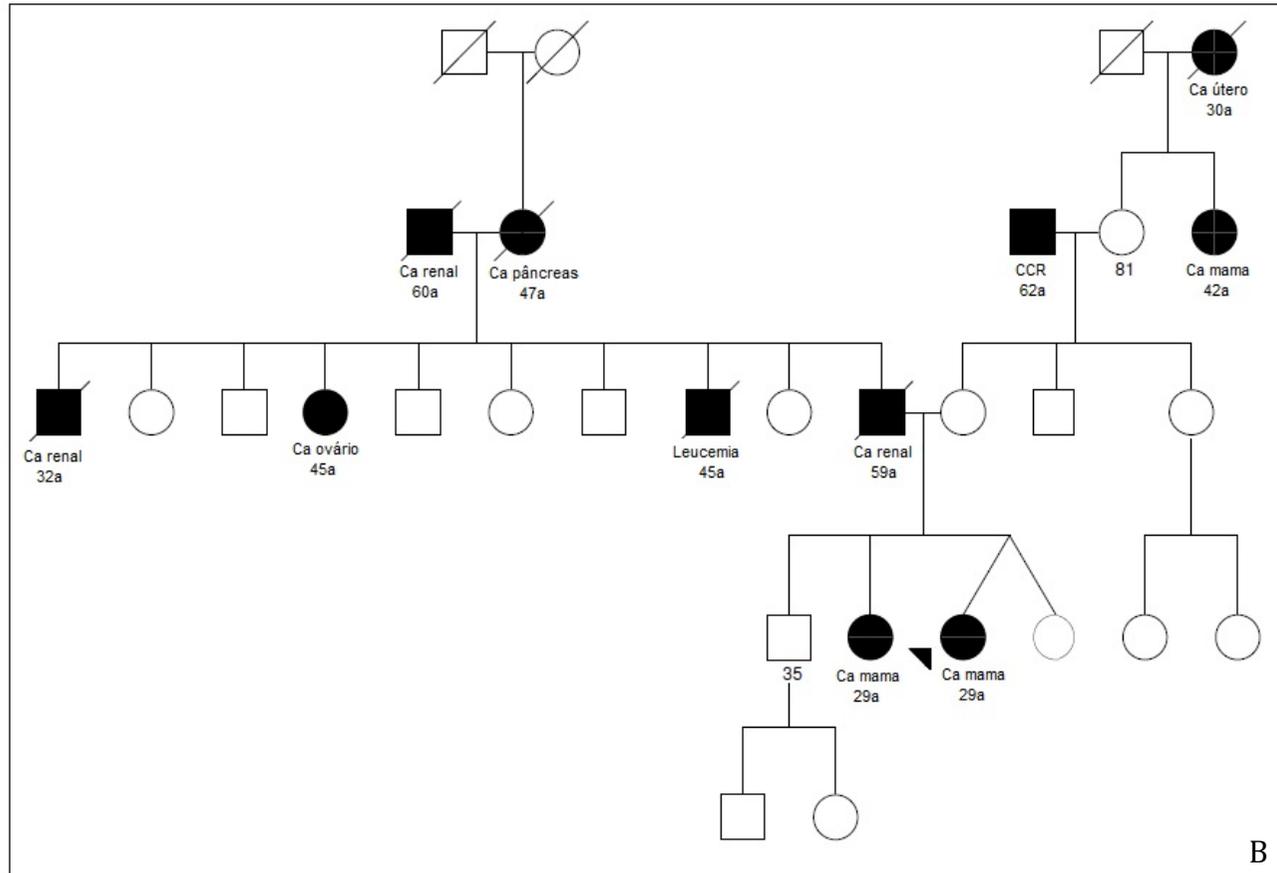


**Figura 11** - Representação esquemática do ganho envolvendo o gene *KIAA1211* e *FOXN3* e o heredograma da paciente SM98. **A.** Ganho envolvendo o gene *KIAA1211*, mapeado em 4q12. **B.** Ganho envolvendo o gene *FOXN3*, mapeado em 14q32.11. **C.** Heredograma do caso SM98. A paciente SM98 (IV:1) desenvolveu câncer de mama aos 30 anos. Ca: câncer; a: idade em anos.

7p22.2: gene *MAD1L1*



A



**Figura 12** - Representação esquemática do ganho envolvendo o gene *MAD1L1* e o heredograma da paciente VCS. **A.** Ganho envolvendo o gene *MAD1L1*, mapeado em 7p22.2. **B.** Heredograma do caso VCS. A paciente VCS (seta) foi diagnosticada com câncer de mama aos 29 anos. Ca: câncer; a: idade em anos.

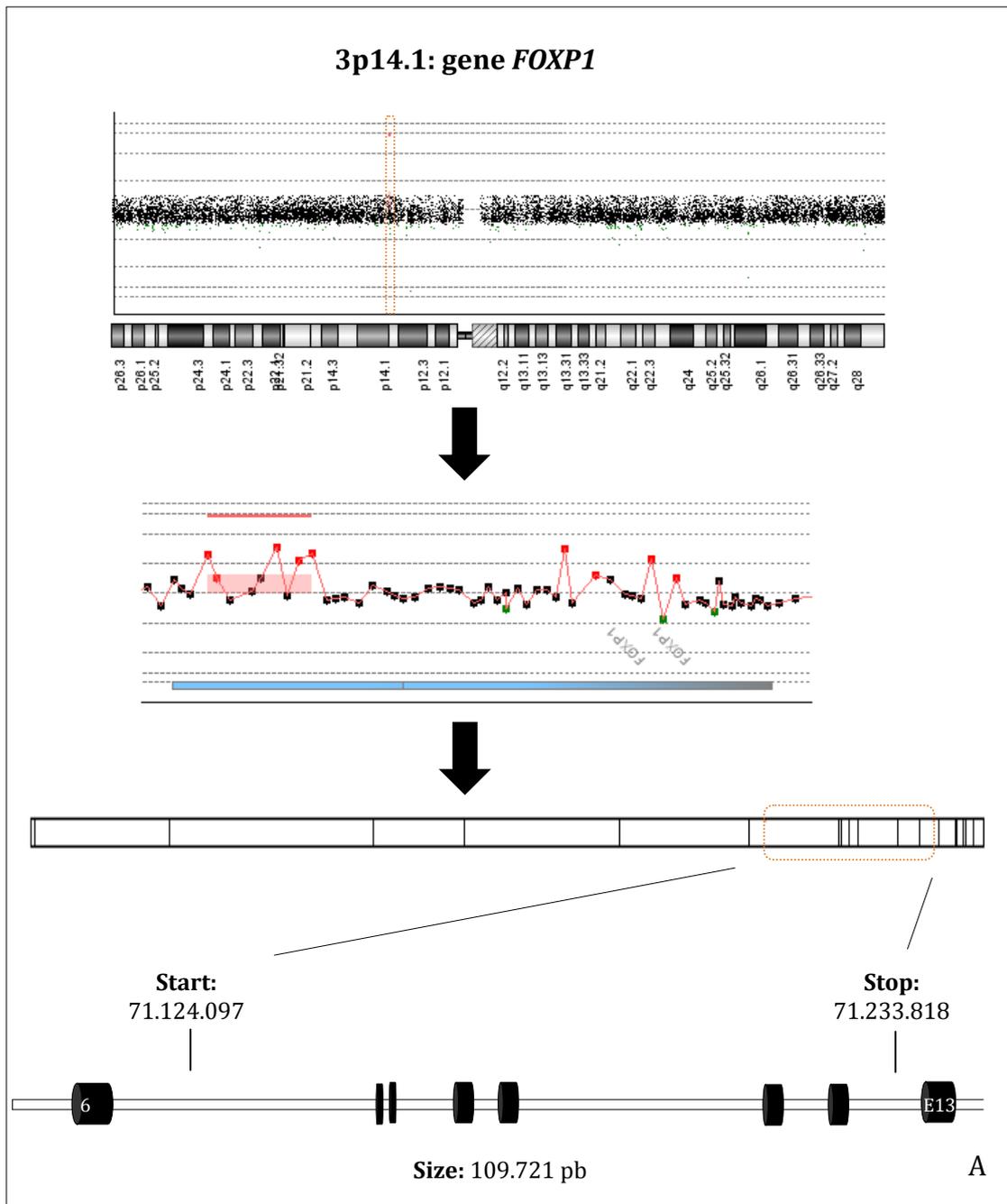
Entre as CNVs novas raras exclusivas do grupo 2, foram identificadas seis alterações envolvendo os genes *FOXP1* (mapeado em 3p14.1), *PTPRN2* (mapeado em 7q36.3), *RCBTB1* (mapeado em 13q14.3), *BLM* (mapeado em 15q26.1) e *ACOX*, *LOC100134934*, *CDK3* (mapeados em 17q25.1).

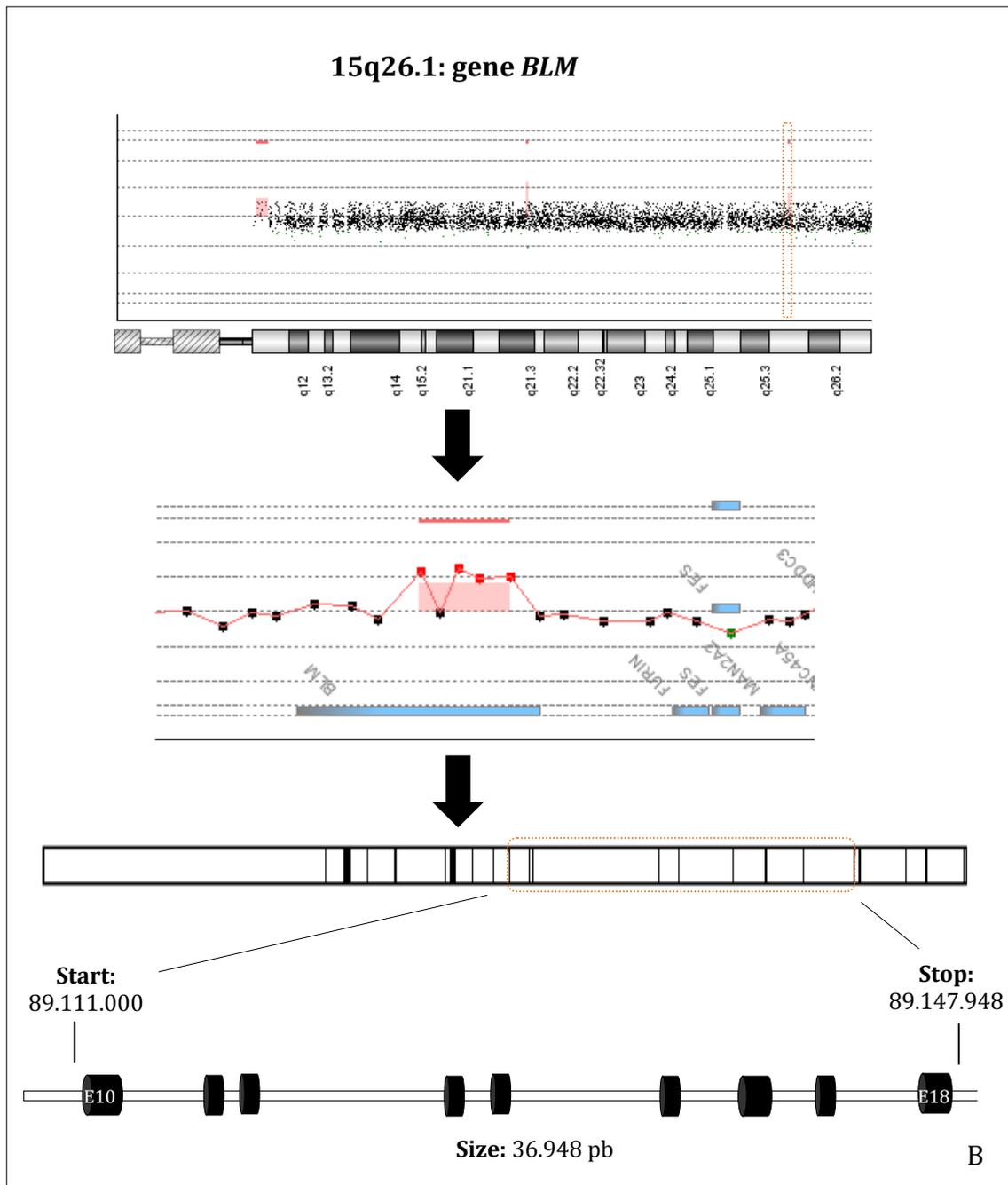
O caso SM87 apresentou um total de 22 CNVs, sendo três novas raras, envolvendo os genes *FOXP1*, *BLM*, *ACOX*, *LOC100134934* e *CDK3*. O gene *FOXP1* possui 59 sondas mapeadas na plataforma, sendo nove envolvidas no ganho identificado entre os íntrons 6-7 e 12-13 e englobando 109.721 pb (Figura 13A). O ganho na região cromossômica 15q26.1 englobou 5/9 sondas mapeadas no gene *BLM*. A alteração com 36.948 pb foi localizada entre os íntrons 9-10 ao 18-19 (Figura 13B). Os genes *ACOX*, *LOC100134934* e *CDK3*, mapeados na região 17q25.1, estão envolvidos em ganho genômico. O gene *ACOX* é representado por quatro sondas e os genes *LOC100134934* e *CDK3* por apenas uma. A alteração de 33.362 pb englobou uma sonda de cada gene (Figura 13C). A irmã da paciente SM87 (SM87.2 ou III:1), concordou em participar deste estudo, porém as alterações apresentadas acima não foram identificadas na família.

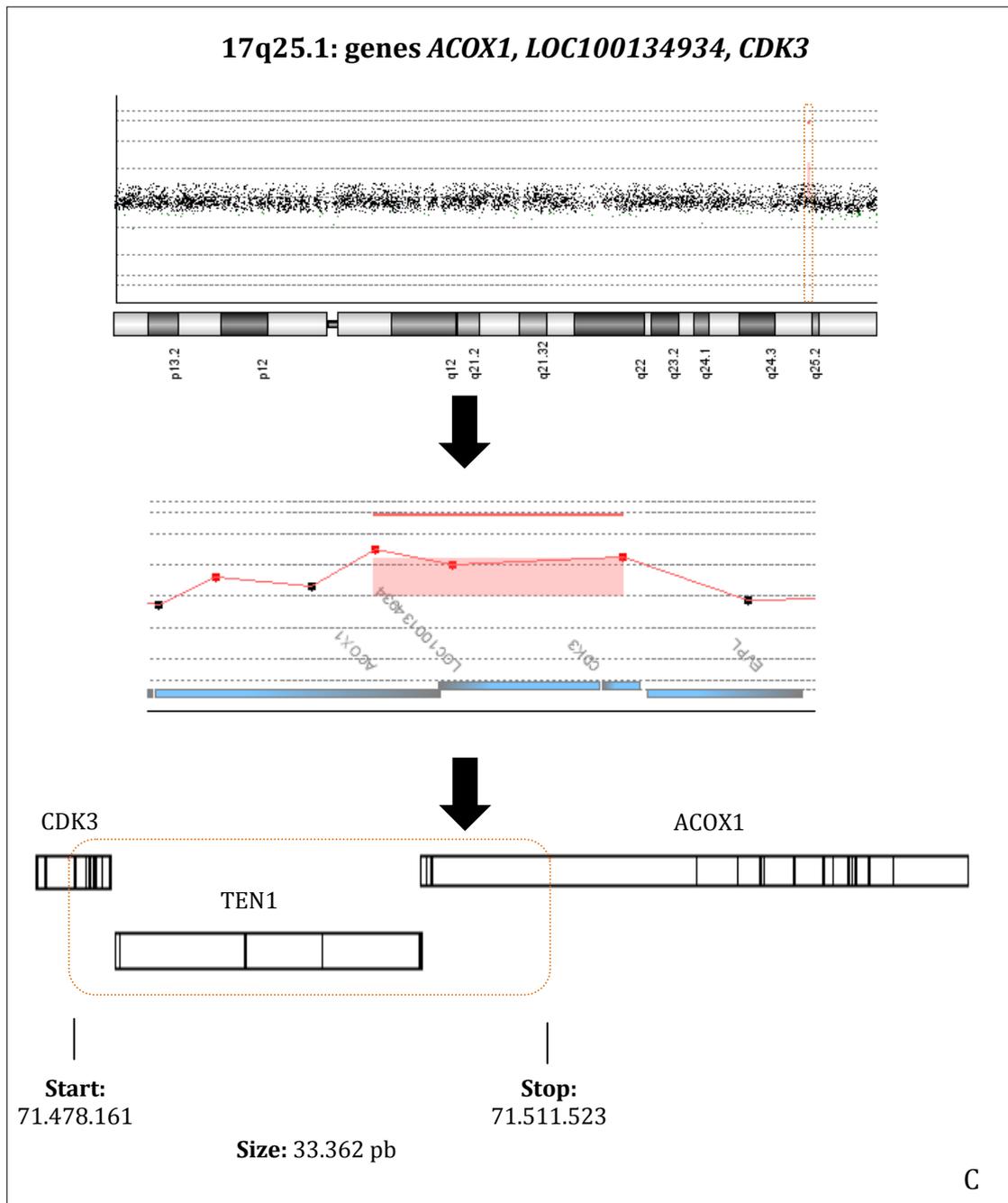
A deleção em 7q36.3 envolvendo o gene *PTPRN2* foi identificada na paciente SM6 e na sua filha (SM6.3 ou III:3). Nessa região cromossômica também foi identificado o microRNA, hsa-mir-595. O gene *PTPRN2* é representado por 91 sondas mapeadas, porém apenas quatro delas, localizadas no íntron 1-2, foram identificadas como alteradas. A CNV foi

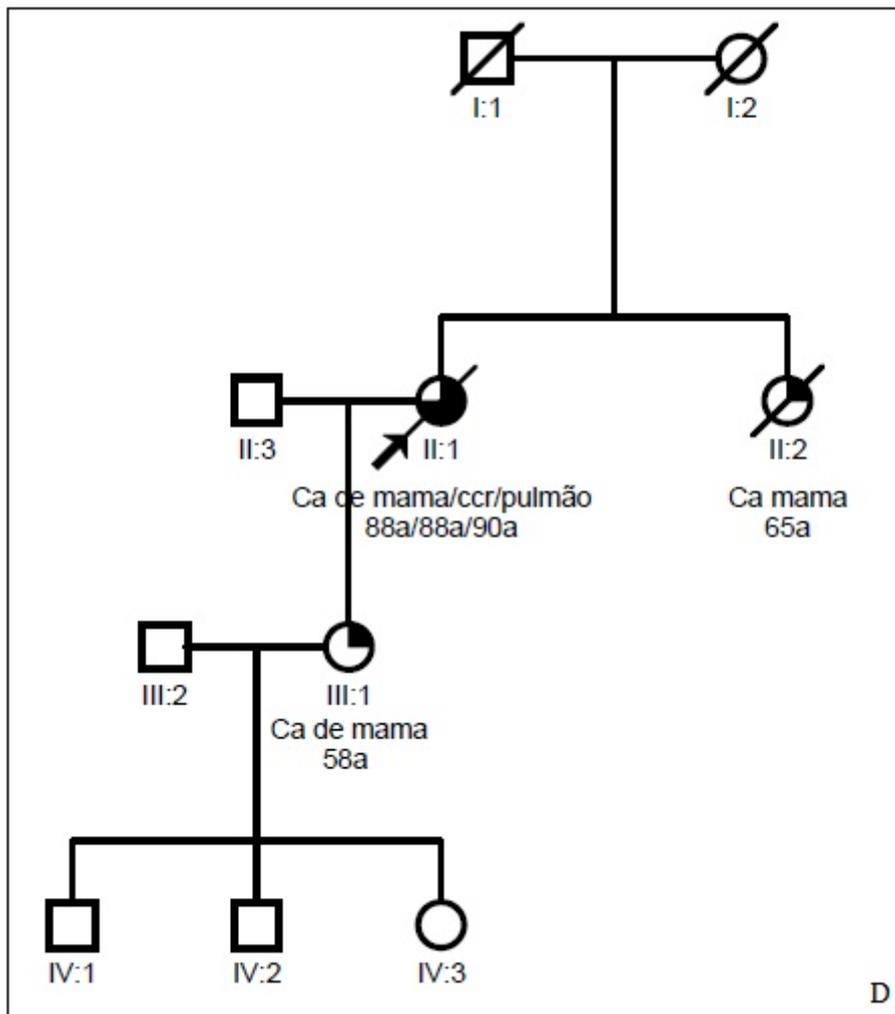
idêntica tanto no tamanho, 19.956 pb, como no número de sondas envolvidas (Figura 14).

O ganho do gene *RCBTB1*, mapeado em 13q14.3, foi identificado no caso SM37 e em seus filhos (SM37.3 ou IV:1 e SM37.4 ou IV:2), ambos sem história pessoal de câncer. A mesma paciente apresentou uma CNV nova rara, envolvida em perda, englobando o gene *ROBO1*, que será descrita no item 4.3 desta seção. O tamanho da alteração em 13q14.3 foi 22.387 pb e a região envolvida no ganho está mapeada entre os íntrons 1-2 e 2-3. Há 12 sondas desse gene na plataforma, sendo cinco envolvidas na alteração (Figura 15).

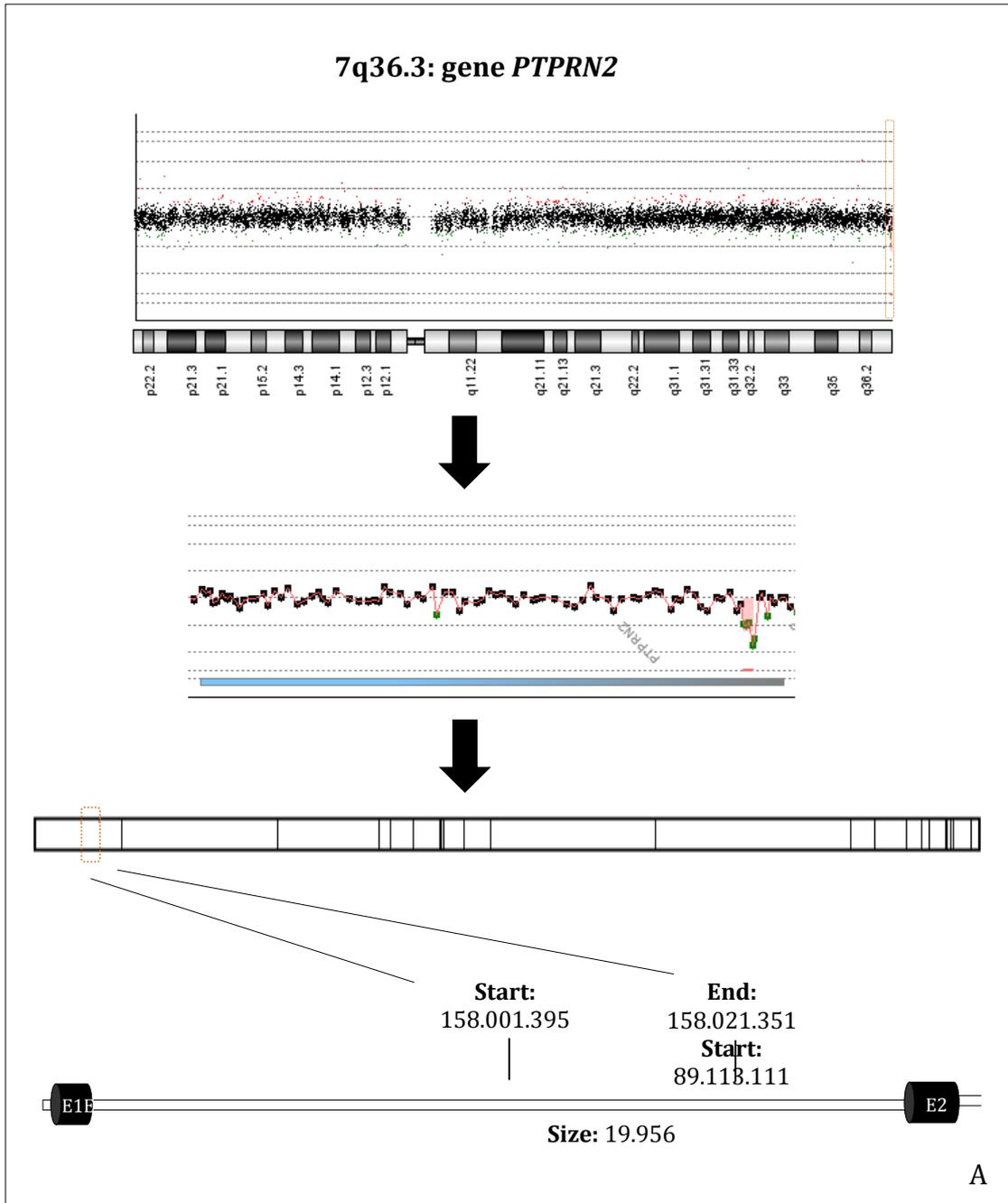


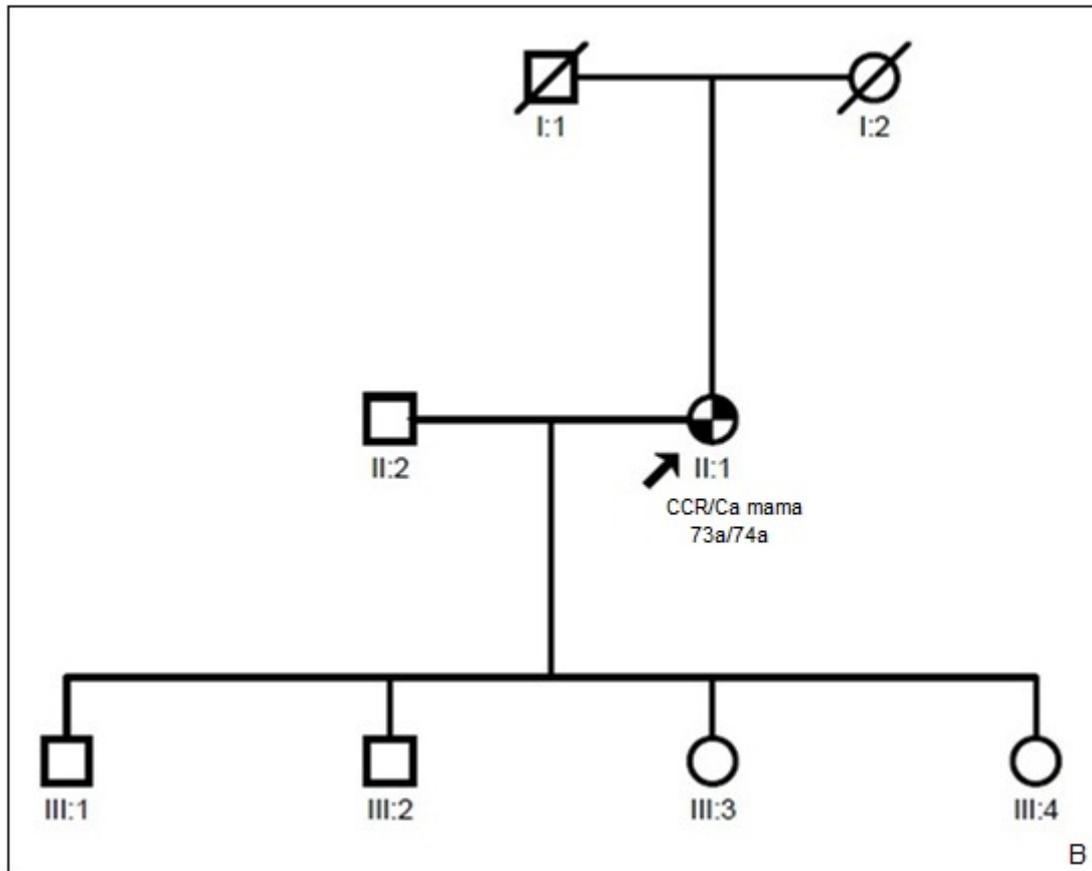




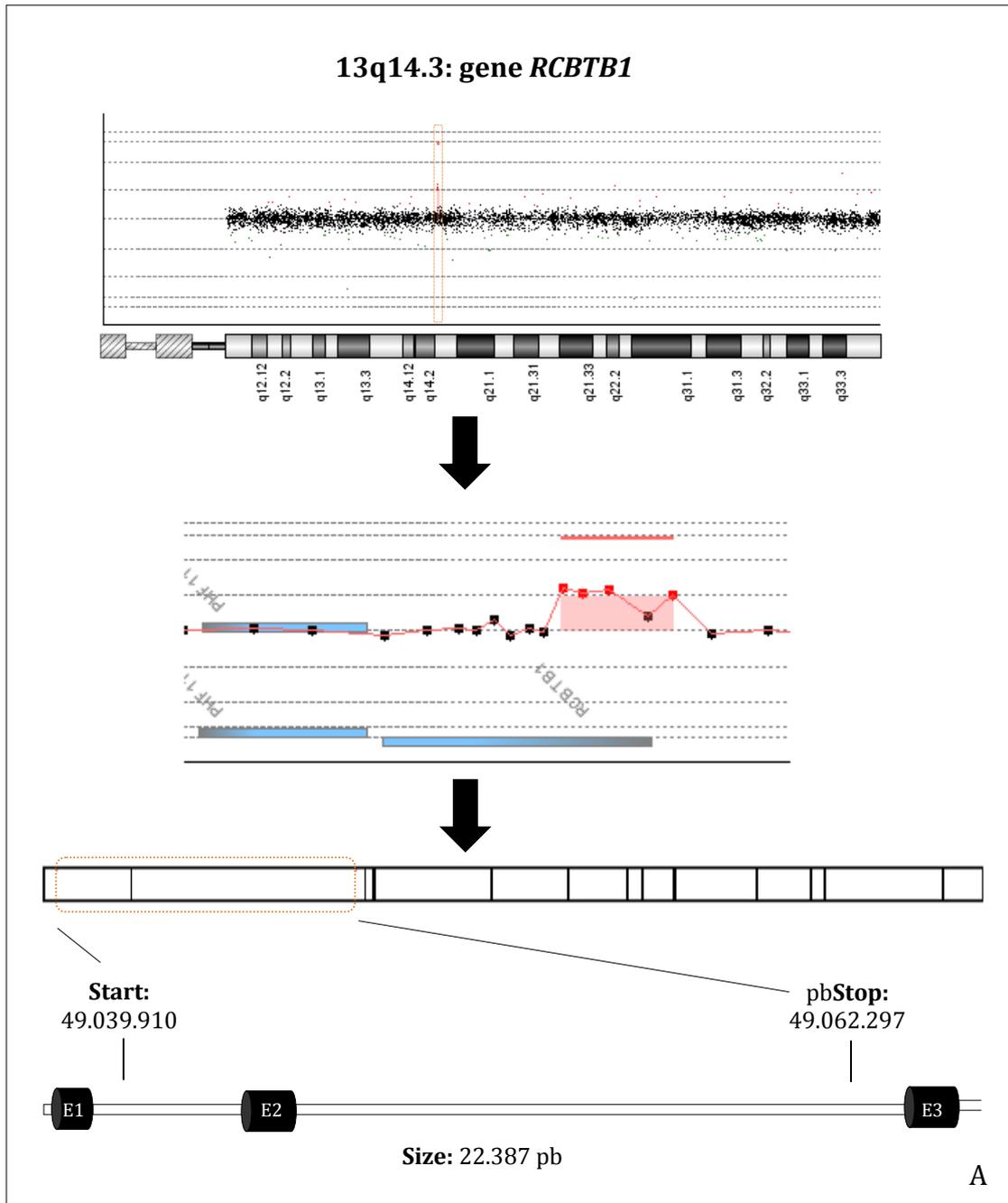


**Figura 13** - Representação esquemática das alterações identificadas na paciente SM87. **A.** Ganho envolvendo o gene *FOXP1*, mapeado em 3p14.1. **B.** Ganho envolvendo o gene *BLM*, mapeado em 15q26.1. **C.** Ganho envolvendo o gene *ACOX1*, *LOC100134934*, *CDK3*, mapeados em 17q25.1. **D.** Heredograma do caso SM87. A probanda do estudo SM87 (II:1) apresentou câncer de mama e CCR aos 88 anos; a filha SM87.2 (III:1) foi diagnosticada com câncer de mama aos 58 anos. Ca: câncer; a: idade em anos.





**Figura 14** - Representação esquemática da perda envolvendo o gene *PTPRN2* e o heredograma da paciente SM6. **A.** Perda envolvendo o gene *PTPRN2*, mapeado em 7q36.3. **B.** Heredograma do caso SM6. A paciente SM6 (II:1) apresentou CCR e câncer de mama aos 73 e 74 anos, respectivamente; o filho (SM6.2 ou III:1) e a filha (SM6.3 ou III:3) não possuem história pessoal de câncer. Ca: câncer; a: idade em anos.



**Figura 15** - Representação esquemática do ganho envolvendo o gene *RCBTB1*, mapeado em 13q14.3. O heredograma da paciente SM37 será apresentado no item 4.3 desta seção.

Além da análise envolvendo todas as pacientes do grupo 1 e grupo 2, foi realizada uma análise comparando as CNVs identificadas nas pacientes que desenvolveram tumor acima dos 60 anos. Nessa análise, foram selecionados três pacientes do grupo 1 e nove do grupo 2. Entre as CNVs identificadas nos pacientes do grupo 1, não foram observadas CNVs em comum. Porém, no grupo 2 identificou-se 12 CNVs compartilhadas entre os pacientes, sendo 11 CNVs comuns e uma CNV rara. Nessa análise, observou-se que apenas 3/12 pacientes apresentaram mais de 10 CNVs.

#### 4.2.2 Casos com mutação

Foram identificadas 33 alterações nos seis pacientes positivos para mutações nos genes *BRCA1* (SM50, SM89, SM102), *BRCA2* (SM86) e *MLH1* (SM41, SL36) (Tabela 18).

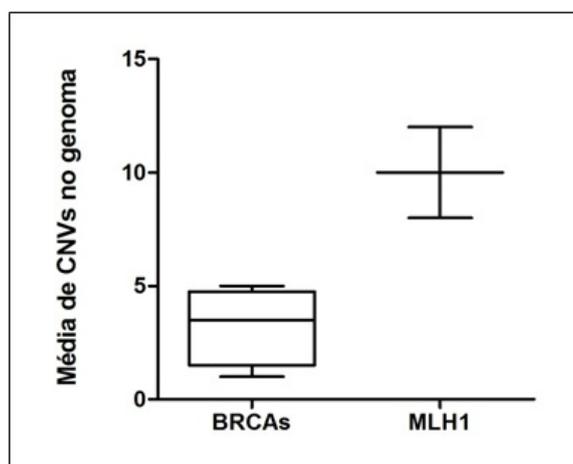
**Tabela 18** - Total de CNVs identificadas nos pacientes com mutação.

Genes	Casos	Grupo	Tumor (idade)	Nº total de CNVs
<b>BRCA1</b>	SM50	2	Mama (36a); CCR (47a)	3
	SM89	1	Mama (40a)	5
	SM102	2	CCR (53a); mama (63a)	1
<b>BRCA2</b>	SM86	1	Mama (45a)	4
<b>MLH1</b>	SM41	1	Mama (35a)	12
	SL36	2	CCR (43a); mama (50a)	8

**Legenda.** a: anos

Resumidamente, as pacientes com mutação nos genes *BRCA1* e *BRCA2* apresentaram um número inferior de CNVs (13 CNVs envolvendo 13 regiões cromossômicas) quando comparadas com as pacientes com

mutações no gene de reparo *MLH1* (20 CNVs englobando 20 regiões cromossômicas) (Figura 16).



**Figura 16** - Representação gráfica do total de alterações genômicas identificadas nos pacientes positivas para mutações nos genes *BRCA1/BRCA2* e *MLH1*.

As pacientes com mutações patogênicas nos genes *BRCA1/BRCA2* apresentaram entre 1 (SM102) a 5 (SM89) CNVs (média: 3,25 CNVs/indivíduo e dp: 1,71 CNVs/indivíduo). Dentre essas alterações, seis (46,15%) regiões estavam envolvidas em ganhos e sete (53,85%) em perdas genômicas. O tamanho das regiões de ganho variaram entre 26,9 Kb a 669,3 Kb (26.966 a 669.271 pb), envolvendo o total de 17 genes e um microRNA, enquanto as perdas variaram de 19,3 Kb a 427,4 Kb (19.390 a 427.433 pb), englobando oito genes.

Entre as pacientes com mutação no gene *MLH1* foram detectadas 8 CNVs no caso SM41 e 12 no caso SL36 (média: 10,0 CNVs/indivíduo e dp: 2,83 CNVs/indivíduo). Foram observadas oito (40,0%) regiões envolvidas em ganhos e 12 (60,0%) em perdas genômicas. O tamanho das regiões de

ganho variaram entre 18,0 Kb a 1,5 Mb (18.039 a 1.513.410 pb), envolvendo 23 genes e um microRNA, enquanto as perdas variaram de 24,5 Kb a 3,4 Mb (24.499 a 3.744.294 pb), englobando 180 genes e quatro microRNAs.

O tamanho das CNVs, envolvidas tanto em ganhos como em perdas, identificadas nos pacientes com mutação no gene *MLH1* foi maior quando comparado com os pacientes com mutação nos genes *BRCA1* e *BRCA2*. Porém essa diferença não foi significativa ( $P= 0,6982$  e  $P= 0,8327$ , respectivamente; Teste de Mann-Whitney).

Entre os microRNAs identificados nos pacientes com mutação, apenas o hsa-mir-1268, envolvido em ganho genômico e mapeado em 15q11.2, foi detectado em mais de um paciente SM86 (*BRCA2*) e SM41 (*MLH1*). Porém essa alteração não foi idêntica e foi também identificada em pacientes não portadores de mutações (Tabela 19).

Após a comparação com o grupo de referência (100 mulheres brasileiras saudáveis) e com o banco de dados DGV, as pacientes portadoras de mutações em *BRCA1/BRCA2* apresentaram oito CNVs raras (quatro ganhos e quatro perdas genômicas) e uma nova rara (ganho genômico). As pacientes portadoras de mutação em *MLH1* apresentaram 11 CNVs raras (seis ganhos e cinco perdas genômicas) e duas novas raras (um ganho e uma perda genômica).

Na Tabela 18 estão representadas todas as CNVs identificadas nos pacientes SM50, SM89, SM102, SM86, SM41 e SL36.

**Tabela 18** - Alterações identificadas nos pacientes com mutação nos genes *BRCA1*, *BRCA2* e *MLH1*.

<b>BRCA1</b>												
Casos	Região Cromossômica	Start	End	Tamanho (pb)	Grupo Controle	Tipo CNV	Nº Sondas	Evento	P valor	Genes	MicroRNAs	Nº CNVs
<b>SM89 (G1)</b>	3q26.1	163997028	164101976	104948	>1%	Comuns	6	P	6,64E-72	-*	-	++
	4q13.2	69074940	69145174	70234	>1%	Comuns	6	P	6,73E-42	<i>UGT2B17</i>	-	++
	6q14.1	79035691	79080188	44497	>1%	Comuns	3	P	3,40E-47	-*	-	++
	Xp22.2	11023614	11140914	117300	0	Nova rara	10	G	3,21E-34	<i>HCCS, ARHGAP6</i>	-	-
	Xp22.2	15489239	15693445	204206	0	Rara	19	G	1,76E-49	<i>ACE2, TMEM27, CA5BP, CA5B</i>	-	+
<b>SM50 (G2)</b>	6p11.2	57354689	57598026	243337	0	Rara	21	G	4,36E-11	<i>PRIM2</i>	-	++
	7q34	142535765	142616483	80718	0	Rara	7	P	1,33E-14	<i>PIP, TAS2R39</i>	-	+
	9p21.1	31161777	31589210	427433	0	Rara	19	P	2,12E-30	-*	-	+
<b>SM102 (G2)</b>	6p21.33	29962649	29982112	19463	1%	Rara	3	p	6,28E-21	<i>HLA-H, HCG2P7</i>	-	++
<b>BRCA2</b>												
Casos	Região Cromossômica	Start	End	Tamanho (pb)	Grupo Controle	Tipo	Nº Sondas	Evento	P valor	Genes	MicroRNAs	Nº CNVs
<b>SM86 (G1)</b>	1p31.1	72541243	72568209	26966	>1%	Comuns	3	G	3,04E-14	-*	-	++
	14q11.1 - q11.2	18798441	19467712	669271	0	Rara	12	G	8,01E-18	<i>P704P, OR4Q3, OR4M1, OR4N2, OR4K2, OR4K5</i>	-	++
	15q11.2	19536835	20060261	523426	1%	Rara	23	G	2,48E-45	<i>LOC727924, OR4M2, OR4N4, LOC650137</i>	hsa-mir-1268	++
	22q11.23	22701005	22720395	19390	0	Rara	3	P	3,64E-15	<i>LOC391322, GSTT1, GSTTP2</i>	-	++

Cont/ Tabela 18

<b>MLH1</b>												
Casos	Região Cromossômica	Start	End	Tamanho (pb)	Grupo Controle	Tipo CNV	Nº Sondas	Evento	P valor	Genes	MicroRNAs	Nº CNVs
	1p31.1	72541243	72652273	111030	>1%	Comuns	5	G	4,85E-22	-*	-	++
	1q21.3	150822873	150853058	30185	>1%	Comuns	3	P	1,57E-21	<i>LCE3C, LCE3B</i>	-	++
	1q44	246794352	246875216	80864	>1%	Comuns	7	P	7,97E-11	<i>OR2T34, OR2T10, OR2T11, OR2T35</i>	-	++
	2p22.3	34556234	34580733	24499	>1%	Comuns	3	P	2,11E-59	-*	-	++
	5p15.33	811969	873565	61596	1%	Raras	3	P	4,96E-10	<i>ZDHHC11</i>	-	++
	6p11.2	57354689	57598026	243337	0	Raras	21	G	1,36E-11	<i>PRIM2</i>	-	++
	6p21.32	32587805	32630048	42243	>1%	Comuns	3	P	4,88E-47	<i>HLA-DRB5, HLA-DRB6</i>	-	++
	6p21.33	29962649	30004836	42187	>1%	Comuns	5	P	8,72E-18	<i>HLA-H, HCG2P7, HCG4P6, FAM20C, PDGFA, PRKAR1B, HEATR2, UNC84A, C7orf20, ADAP1, COX19, CYP2W1, C7orf50, GPR146, GPER, ZFAND2A, UNCX, MICALL2, INTS1, MAFK, TMEM184A, PSMG3, KIAA1908, TFAMP1, ELFN1, MAD1L1, FTSJ2, NUDT1, SNX8, EIF3B, CHST12, LFNG, C7orf27, IQCE, TTYH3, AMZ1, GNA12, CARD11</i>	-	++
<b>SM41 (G1)</b>	7p22.3 - p22.2	250032	3180773	2930741	0	Raras	198	P	9,90E-68	<i>SH2D4A, CSGALNACT1</i>	hsa-mir-339	++
	8p21.3	19221099	19482436	261337	0	Raras	23	G	1,46E-31	<i>SH2D4A, CSGALNACT1</i>	-	+
	14q32.2	95601727	95657184	55457	0	Novas Raras	4	P	2,09E-10	<i>C14orf132, LOC727832, GOLGA8C, LOC646214, CXADRP2, POTE, LOC727924, OR4M2, OR4N4, LOC650137, GOLGA8D, LOC283767</i>	-	-
	15q11.2	18835460	20366870	1531410	0	Raras	47	G	6,31E-27	<i>LOC727924, OR4M2, OR4N4, LOC650137, GOLGA8D, LOC283767</i>	hsa-mir-1268	++

**Cont/ Tabela 18**

Casos	Região Cromossômica	Start	End	Tamanho (pb)	Grupo Controle	Tipo CNV	Nº Sondas	Evento	P valor	Genes	MicroRNAs	Nº CNVs
SL36 (G2)	1p21.1	103899571	104012720	113149	0	Raras	6	G	2,32E-11	AMY2B, LOC648740, AMY2A, AMY1A, AMY1C, AMY1B	-	++
	1p31.1	72541243	72568209	26966	>1%	Comuns	3	P	1,24E-09	-*	-	++
	20q12	40298071	40622903	324832	0	Raras	29	G	1,98E-15	PTPRT	-	+
	5p15.33	204537	2430105	2225568	0	Raras	146	P	5,40E-45	PLEKHG4B, LOC389257, CCDC127, SDHA, PDCD6, AHRR, C5orf55, EXOC3, LOC25845, SLC9A3, CEP72, TPPP, ZDHHC11, BRD9, BRD9, TRIP13, NKD2, SLC12A7, SLC6A19, SLC6A18, TERT, CLPTM1L, SLC6A3, LPCAT1, SDHAP3, LOC728613, MRPL36, NDUFS6, IRX4	-	++
	6p21.33	29962649	30026899	64250	0	Raras	6	P	4,66E-14	HLA-H, HCG2P7, HCG4P6, HLA-A29.1, HLA-A	-	++
	11p15.5 - p15.4	200100	3944394	3744294	0	Raras	279	P	2,76E-79	Vários	hsa-mir-210, hsa-mir-675, hsa-mir-483	++
	14q23.1	60588068	60606107	18039	0	Novas Raras	3	G	2,26E-09	SLC38A6	-	-
	17q21.31	41527505	41635736	108231	1%	Raras	10	G	2,23E-12	KIAA1267	-	++

**Legenda.** P: perda genômica; G: ganho genômico; - ausente; + ≤3 CNVs descritas no DGV; ++ mais de 3 CNVs descritas no DGV; \* regiões cromossômicas analisadas no Hg19: somente a aliação em 3q16.1 (caso SM89) apresentou gene mapeado (*BC073807*), porém este não codifica proteína.

### 4.2.3 Análise de CNVs entre os familiares

A seleção de familiares foi realizada após uma análise prévia dos resultados de CGH *array*. Nessa análise, as CNVs foram classificadas em comuns (presente no grupo de referência) e raras (ausente no grupo de referência e com até três descrições no banco de dados DGV). As CNVs novas raras foram categorizadas de acordo com a Tabela 7, apresentada no item 3.2.3 da seção Material e Métodos. Em seguida, utilizando-se o banco de dados GeneCards (<http://www.gencards.org> - *The Human Gene Compendium*) e o PUBMED (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed> - *US National Library of Medicine*), foram selecionados os genes com envolvimento em processos tumorais. Dessa maneira, os familiares dos pacientes que apresentavam essas alterações genômicas específicas foram convidados a participar do estudo.

Com isso, foram avaliados membros de oito famílias (Grupo 1: SM26, SM56 e SM83; Grupo 2: SM6, SM34, SM37, SM87; Grupo 3: SM89), sendo cinco do grupo 1, nove do grupo 2 e seis do grupo 3. As alterações identificadas nos probandos foram comparadas com as CNVs identificadas nos seus familiares assim como com o grupo de referência e com o banco de dados DGV.

Nas Tabelas 20 a 26 estão representadas todas as CNVs identificadas nos pacientes e em seus respectivos familiares. As CNVs identificadas na família da paciente SM89 serão descritas na seção 4.3.2 desta seção.

Na Tabela 20 estão representadas as alterações identificadas na família SM6. Além da paciente SM6 (II:1) diagnosticada com câncer colorretal aos 73 anos e câncer de mama aos 74, fizeram parte do estudo seu filho (SM6.2; III:1) e sua filha (SM6.3; III:3), ambos sem história pessoal de câncer. Entre as alterações observadas nesta família, apenas quatro segregaram entre os familiares. As alterações mapeadas em 1p31.1, 6p21.32 e 15q11.2 representam CNVs comuns, porém a região cromossômica 7q36.3, envolvida em perda genômica, representa uma CNV nova rara. Essa alteração foi descrita e detalhada no item 4.2.1 desta seção.

A Tabela 21 representa as CNVs identificadas na família SM26. A paciente foi diagnosticada com CCR aos 78 anos e sua filha, SM26.2 (IV:1) foi diagnosticada com câncer de mama aos 45 anos. Nesta família, nove CNVs apresentaram segregação: sete CNVs comuns (1p31.1, 2p22.3, 3q26.1, 3q29, 8p11.23, 11q11, 16p11.2) e duas CNVs raras (19p12, Xq22.2). A perda genômica identificada em 19p12 envolveu o gene *ZNF826* e o ganho em Xp22.2 envolveu os genes *TMSB15B*, *H2BFXP* e *H2BFWT*.

As CNVs identificadas na família SM34 estão representadas na Tabela 22. A paciente SM34 foi diagnosticada com câncer de mama e colorretal aos 56 e 58 anos, respectivamente. Duas irmãs da paciente participaram do estudo: SM34.2 (III:5) e SM34.3 (III:6), porém apenas a SM34.2 apresentou história pessoal de câncer (câncer de mama aos 64 anos). Foram identificadas duas CNVs comuns e quatro CNVs raras nesta família. Todas as CNVs raras estavam envolvidas em perdas genômicas. Entre elas, duas foram identificadas tanto na paciente SM34 como nos

familiares com (SM34.2) e sem (SM34.3) história de câncer. As regiões envolvidas nessas alterações foram 6q12, englobando o gene *EYS* e 20p12.3, englobando o gene *PLCB1*. A perda genômica em 3q29, identificada na SM34 e SM34.2, envolveu os genes *BDH1*, *LOC220729*, *KIAA0226*, *FXTTD1* e *LRCH3*. A alteração em 20p12.3, identificada na SM34 e SM34.3, envolveu o gene *PLCB1*.

Na família SM37 foram identificadas cinco CNVs que segregavam entre os familiares (Tabela 23). Participaram do estudo quatro parentes da paciente SM37 (III:1): dois filhos (SM37.3 ou IV:1 e SM37.4 ou IV:2), uma filha (SM37.2 ou IV:3) e um irmão (SM37.5 ou III:8). Entre os familiares, apenas a filha, SM37.2, apresentou história pessoal de câncer (câncer de mama aos 55 anos). Entre as alterações observadas, três eram CNVs comuns (2q37.3, 14q32.33 e 15q14), uma CNV rara (4q31.22) e uma CNV nova rara (13q14.3). A região cromossômica 13q14.3, envolvida em ganho, foi descrita no item 4.2.1 desta seção.

Nenhuma das alterações identificadas na paciente SM56 segregou entre os familiares (Tabela 24). A probanda SM56 desenvolveu câncer de mama aos 50 anos; uma irmã, SM56.2 (III:5), apresentou câncer de endométrio aos 58 anos e outra irmã, SM56.3 (III:6) não apresentou história pessoal de câncer.

Na Tabela 25 estão representadas as alterações identificadas na família SM83. Participaram deste estudo a paciente SM83 (IV:1) que foi diagnosticada com câncer de mama aos 35 anos, a irmã gêmea SM83.2 (IV:2) e a mãe SM83.3 (III:2), ambas sem história pessoal de câncer. Nesta

família foi identificada apenas uma CNV comum idêntica tanto na probanda como na irmã SM83.2.

Na família SM87, quatro CNVs apresentaram segregação entre os indivíduos (Tabela 26). Entre as alterações, três eram CNVs comuns (1p31.1, 1q21.1 e 22q13.1) e uma rara (12q24.33). A perda genômica envolvida na região 12q24.33 não possui gene conhecido descrito. A alteração foi observada na paciente SM87 (II:1), que apresentou câncer de mama e CCR aos 88 anos, e na sua filha SM87.2 (III:1) que desenvolveu câncer de mama aos 58 anos. Três alterações novas raras foram identificadas na paciente SM87, porém estas não segregaram na família.

**Tabela 20** - Alterações identificadas na paciente SM6 (CCR aos 73 anos e câncer de mama aos 74) e seus familiares (SM6-2 e SM6-3 sem história de câncer).

**Família SM6 (G2)**

Casos	Região Cromossômica	Start	End	Tamanho (pb)	Grupo Controle	Tipo CNV	Nº Sondas	Evento	P valor	Genes	MicroRNAs	Nº CNVs
SM6		72541243	72568209	26966	>1%	Comum	3	P	1,64E-17	-	-	++
SM6.2	1p31.1	72541243	72568209	26966	>1%	Comum	3	P	2,36E-18	-	-	++
SM6.3		72541243	72568209	26966	>1%	Comum	3	G	2,06E-12	-	-	++
SM6	3q26.1	163997028	164101976	104948	>1%	Comum	6	P	7,62E-97	-	-	++
SM6	6p21.32	32587805	32630048	42243	>1%	Comum	3	P	3,19E-17	<i>HLA-DRB5, HLA-DRB6</i>	-	++
SM6.3		32587805	32630048	42243	>1%	Comum	3	P	2,63E-15	<i>HLA-DRB5, HLA-DRB6</i>	-	++
SM6	6p21.33	29962649	29982112	19463	1%	Rara	3	P	1,71E-15	<i>HLA-H, HCG2P7</i>	-	++
SM6	7q36.3	158001395	158021351	19956	0	Nova rara	5	P	1,25E-26	<i>PTPRN2</i>	hsa-mir-595	-
SM6.3		158001395	158021351	19956	0	Nova rara	5	P	3,93E-15	<i>PTPRN2</i>	hsa-mir-595	-
SM6	15q11.2	18741516	20060261	1318745	>1%	Comum	46	G	9,80E-267	<i>LOC727832, GOLGA8C, LOC646214, CXADRP2, POTEb, LOC727924, OR4M2, OR4N4, LOC650137</i>	hsa-mir-1268	++
SM6.3		18741516	20060261	1318745	>1%	Comum	46	G	1,87E-207	<i>LOC727832, GOLGA8C, LOC646214, CXADRP2, POTEb, LOC727924, OR4M2, OR4N4, LOC650137</i>	hsa-mir-1268	++
SM6.2	15q11.2	18692665	20060261	1367596	1%	Rara	47	G	7,12E-168	<i>LOC727832, GOLGA8C, LOC646214, CXADRP2, POTEb, LOC727924, OR4M2, OR4N4, LOC650137</i>	hsa-mir-1268	++
SM6	22q11.23	22677759	22720395	42636	>1%	Comum	5	G	6,26E-13	<i>LOC391322, GSTT1, GSTTP2</i>	-	++

**Legenda.** P: perda genômica; G: ganho genômico; - ausente; + ≤3 CNVs descritas no DGV; ++ mais de 3 CNVs descritas no DGV.

**Tabela 21** - Alterações identificadas na paciente SM26 (CCR aos 78 anos) e sua filha SM26-2 (câncer de mama aos 45 anos).

<b>Família SM26 (G1)</b>												
Casos	Região Cromossômica	Start	End	Tamanho (pb)	Grupo Controle	Tipo CNV	Nº Sondas	Evento	P valor	Genes	MicroRNAs	Nº CNVs
SM26	1p31.1	72541243	72568209	26966	>1%	Comum	3	G	1,30E-30	-	-	++
SM26.2		72541243	72568209	26966	>1%	Comum	3	G	2,26E-15	-	-	++
SM26	1p36.33	1217817	1436882	219065	0	Rara	4	G	1,90E-23	ACAP3, PUSL1, CPSF3L, GLTPD1, TAS1R3, DVL1, MXRA8, AURKAIP1, CCNL2, LOC148413, MRPL20, LOC441869, TMEM88B, VWA1, ATAD3C, ATAD3B	-	++
SM26	2p22.3	34556234	34580733	24499	>1%	Comum	3	P	1,03E-45	-	-	++
SM26.2		34556234	34580733	24499	>1%	Comum	3	P	8,62E-44	-	-	++
SM26	3q26.1	163997028	164101976	104948	>1%	Comum	6	P	4,57E-73	-	-	++
SM26.2		163997028	164101976	104948	>1%	Comum	6	P	1,09E-110	-	-	++
SM26	3q29	196904149	196958667	54518	>1%	Comum	9	P	8,84E-14	MUC20	hsa-mir-570	++
SM26.2		196904149	196958667	54518	>1%	Comum	9	P	1,48E-21	MUC20	hsa-mir-570	++
SM26.2	4q13.2	69074940	69145174	70234	>1%	Comum	6	P	9,56E-13	UGT2B17	-	++
SM26.2	6p21.32	32558477	32630048	71571	0	Rara	4	P	3,40E-10	HLA-DRB5, HLA-DRB6	-	++
SM26	7p22.2	2513093	2536948	23855	0	Nova rara	3	G	1,32E-12	LFNG	-	-
SM26	7q22.1	100078445	100117194	38749	0	Rara	4	G	3,10E-12	ACTL6B, GNB2, GIGYF1	-	+
SM26	8p11.23	39356395	39494087	137692	>1%	Comum	12	P	8,80E-81	ADAM5P, ADAM3A	-	++
SM26.2		39356395	39494087	137692	>1%	Comum	12	P	4,48E-127	ADAM5P, ADAM3A	-	++
SM26.2	10q11.22	47040244	47104046	63802	1%	Rara	5	P	1,23E-10	-	-	++

**Cont/ Tabela 21**

Casos	Região Cromossômica	Start	End	Tamanho (pb)	Grupo Controle	Tipo CNV	Nº Sondas	Evento	P valor	Genes	MicroRNAs	Nº CNVs
<b>SM26</b>	10q11.22	46404719	47104046	699327	0	Rara	18	P	1,65E-23	<i>GPRIN2, PPYR1, LOC728643, ANXA8, ANXA8L1, FAM25C, FAM25G, FAM25B, LOC642826</i>	-	++
<b>SM26</b>	11q11	55134286	55207505	73219	>1%	Comum	8	P	7,71E-115	<i>OR4P4, OR4S2, OR4C6</i>	-	++
<b>SM26.2</b>		55134286	55207505	73219	>1%	Comum	8	P	3,43E-117	<i>OR4P4, OR4S2, OR4C6</i>	-	++
<b>SM26</b>	12p13.31	9528390	9604833	76443	>1%	Comum	7	G	4,03E-13	-	-	++
<b>SM26</b>	14q11.1 - q11.2	18798441	19497223	698782	>1%	Comum	14	P	1,49E-18	<i>P704P, OR4Q3, OR4M1, OR4N2, OR4K2, OR4K5, OR4K1</i>	-	++
<b>SM26</b>	16p11.2	32481109	33533640	1052531	>1%	Comum	18	P	2,26E-17	<i>LOC729355, TP53TG3, SLC6A10P</i>	-	++
<b>SM26.2</b>		32481109	33533640	1052531	>1%	Comum	18	P	4,74E-15	<i>LOC729355, TP53TG3, SLC6A10P</i>	-	++
<b>SM26.2</b>	17q21.31	41577320	41653061	75741	1%	Rara	7	G	5,24E-18	<i>KIAA1267</i>	-	++
<b>SM26</b>	19p12	20399500	20493601	94101	0	Rara	5	P	1,09E-13	<i>ZNF826</i>	-	++
<b>SM26.2</b>		20399500	20493601	94101	0	Rara	5	P	3,76E-11	<i>ZNF826</i>	-	++
<b>SM26</b>	20q13.33	60845336	60876102	30766	0	Rara	4	G	3,60E-15	<i>NTSR1</i>	-	+
<b>SM26</b>	21q22.3	45195687	45218964	23277	0	Nova rara	3	G	7,76E-13	<i>C21orf70</i>	-	-
<b>SM26</b>	Xq22.2	103072582	103174860	102278	0	Rara	10	G	1,83E-15	<i>TMSB15B, H2BFXP, H2BFWT</i>	-	++
<b>SM26.2</b>		103072582	103174860	102278	0	Rara	10	G	6,71E-10	<i>TMSB15B, H2BFXP, H2BFWT</i>	-	++

**Legenda.** P: perda genômica; G: ganho genômico; - ausente; + ≤3 CNVs descritas no DGV; ++ mais de 3 CNVs descritas no DGV.

**Tabela 22** - Alterações identificadas na paciente SM34 (câncer de mama aos 56 anos e CCR aos 58) e seus familiares (SM34-2, câncer de mama aos 64 anos, e SM34-3, sem história de câncer) .

Família SM34 (G2)												
Casos	Região Cromossômica	Start	End	Tamanho (pb)	Grupo Controle	Tipo CNV	Nº Sondas	Evento	P valor	Genes	MicroRNAs	Nº CNVs
SM34.3	1p21.1	103899571	104012720	113149	0	Rara	6	G	2,35E-12	AMY2B, LOC648740, AMY2A, AMY1A, AMY1C, AMY1B	-	++
SM34.2	1q21.1	147308357	147645031	336674	>1%	Comum	16	P	7,99E-19	LOC388692, FCGR1C	-	++
SM34		195009158	195066067	56909	>1%	Comum	4	P	1,72E-23	CFHR3, CFHR1	-	++
SM34.2	1q31.3	195009158	195066067	56909	>1%	Comum	4	P	4,80E-32	CFHR3, CFHR1	-	++
SM34.3		195009158	195066067	56909	>1%	Comum	4	P	3,56E-26	CFHR3, CFHR1	-	++
SM34	3q29	198515487	199044044	528557	0	Rara	37	P	5,97E-95	BDH1, LOC220729, KIAA0226, FYTDD1, LRCH3	hsa-mir-922	++
SM34.2		198515487	199044044	528557	0	Rara	37	P	1,40E-117	BDH1, LOC220729, KIAA0226, FYTDD1, LRCH3	hsa-mir-922	++
SM34		65552358	65828618	276260	0	Rara	18	P	3,27E-41	EYS	-	+
SM34.2	6q12	65552358	65828618	276260	0	Rara	18	P	2,11E-37	EYS	-	+
SM34.3		65552358	65828618	276260	0	Rara	18	P	2,40E-31	EYS	-	+
SM34	8p11.23	39356395	39482185	125790	>1%	Comum	11	G	2,08E-38	ADAM5P, ADAM3A	-	++
SM34.3	10q11.22	49339853	49809923	470070	0	Rara	36	G	3,90E-41	ARHGAP22, WDFY4, LRRC18	-	+
SM34.3	11q11	55134286	55207505	73219	>1%	Comum	8	P	1,73E-77	OR4P4, OR4S2, OR4C6	-	++
SM34.3	12p13.31	9528390	9554349	25959	0	Rara	3	P	8,53E-13	-	-	++
SM34	12p13.31	9528390	9564066	35676	>1%	Comum	4	P	1,24E-12	-	-	++
SM34.2		9528390	9564066	35676	>1%	Comum	4	P	2,22E-14	-	-	++
SM34	13q21.32	64630281	64779577	149296	0	Rara	6	P	3,85E-16	-	-	+
SM34.3		64630281	64779577	149296	0	Rara	6	P	6,10E-18	-	-	+

**Cont/ Tabela 22**

Casos	Região Cromossômica	Start	End	Tamanho (pb)	Grupo Controle	Tipo CNV	Nº Sondas	Evento	P valor	Genes	MicroRNAs	Nº CNVs
<b>SM34</b>	16p11.2	32481109	33533640	1052531	>1%	Comum	18	P	1,22E-13	<i>LOC729355, TP53TG3, SLC6A10P</i>	-	++
<b>SM34</b>		8163519	8216565	53046	0	Rara	4	P	2,97E-12	<i>PLCB1</i>	-	++
<b>SM34.2</b>	20p12.3	8163519	8216565	53046	0	Rara	4	P	9,11E-14	<i>PLCB1</i>	-	++
<b>SM34.3</b>		8163519	8216565	53046	0	Rara	4	P	3,01E-14	<i>PLCB1</i>	-	++
<b>SM34</b>	22q11.23	22677759	22720395	42636	>1%	Comum	5	P	1,69E-22	<i>LOC391322, GSTT1, GSTTP2</i>	-	++

**Legenda.** P: perda genômica; G: ganho genômico; - ausente; + ≤3 CNVs descritas no DGV; ++ mais de 3 CNVs descritas no DGV.

**Tabela 23** - Alterações identificadas na paciente SM37 (CCR aos 52 anos e câncer de mama aos 73) e seus familiares (SM37-2 com câncer de mama aos 55 anos, e SM37-3, SM37-4, SM37-5, sem história de câncer) .

<b>Família SM37 (G2)</b>												
Casos	Região Cromossômica	Start	End	Tamanho (pb)	Grupo Controle	Tipo CNV	Nº Sondas	Evento	P valor	Genes	MicroRNAs	Nº CNVs
SM37.3	1p31.1	72541243	72568209	26966	>1%	Comum	3	P	7,93E-26	-	-	++
SM37.4		72541243	72568209	26966	>1%	Comum	3	P	6,55E-15	-	-	++
SM37.2	1p36.13	17104145	17124754	20609	0	Rara	3	P	9,41E-12	<i>CROCC</i>	-	++
SM37	1q21.1	147308357	147510732	202375	>1%	Comum	15	P	2,63E-32	-	-	++
SM37.3	1q21.1	147203077	147510732	307655	1%	Rara	16	P	7,15E-20	<i>LOC645166, LOC645166</i>	-	++
SM37.2	1q24.2	168497999	168525590	27591	0	Nova rara	3	G	1,94E-10	<i>LOC284688</i>	-	-
SM37.5	1q44	246805321	246852326	47005	>1%	Comum	5	P	2,72E-71	<i>OR2T10</i>	-	++
SM37	2p22.3	34556234	34580733	24499	>1%	Comum	3	G	2,75E-12	-	-	++
SM37	2q37.3	242514393	242677269	162876	>1%	Comum	14	P	1,17E-46	-	-	++
SM37.2		242514393	242677269	162876	>1%	Comum	14	P	2,36E-54	-	-	++
SM37.3		242514393	242677269	162876	>1%	Comum	14	P	1,52E-42	-	-	++
SM37.4		242514393	242677269	162876	>1%	Comum	14	P	8,68E-38	-	-	++
SM37.5		242514393	242677269	162876	>1%	Comum	14	P	1,11E-51	-	-	++
SM37	3p12.3*	78990568	79028038	37470	0	Nova rara	4	P	1,19E-18	<i>ROBO1</i>	-	-
SM37.2		78990568	79028038	37470	0	Nova rara	4	P		<i>ROBO1</i>	-	-
SM37.3	3q25.1	152995921	153025401	29480	0	Rara	4	P	1,10E-12	<i>AADAC</i>	-	+
SM37.3	3q26.1	163997028	164101976	104948	>1%	Comum	6	G	8,37E-22	-	-	++
SM37.4	4q13.2	69074940	69145174	70234	>1%	Comum	6	P	3,26E-91	<i>UGT2B17</i>	-	++
SM37	4q31.22	145061838	145197056	135218	0	Rara	5	P	1,65E-18	<i>GYPB</i>	-	++
SM37.3		145061838	145197056	135218	0	Rara	5	P	7,05E-14	<i>GYPB</i>	-	++
SM37	5p15.33	775994	830154	54160	>1%	Comum	3	G	5,25E-14	-	-	++
SM37.4	5p15.33	775994	873565	97571	>1%	Comum	4	G	2,57E-13	<i>ZDHHC11</i>	-	++

**Cont/ Tabela 23**

Casos	Região Cromossômica	Start	End	Tamanho (pb)	Grupo Controle	Tipo CNV	Nº Sondas	Evento	P valor	Genes	MicroRNAs	Nº CNVs
<b>SM37.4</b>	6p21.32	32587805	32630048	42243	>1%	Comum	3	P	1,38E-24	<i>HLA-DRB5, HLA-DRB6</i>	-	++
<b>SM37.5</b>		32587805	32630048	42243	>1%	Comum	3	P	1,89E-23	<i>HLA-DRB5, HLA-DRB6</i>	-	++
<b>SM37.3</b>	6q14.1	79035691	79080188	44497	>1%	Comum	3	P	1,01E-14	-	-	++
<b>SM37.2</b>	7p22.3	1234712	1275138	40426	0	Rara	4	G	4,49E-12	<i>UNCX</i>	-	++
<b>SM37.4</b>	8p11.23	39356395	39494087	137692	>1%	Comum	12	P	8,40E-128	<i>ADAM5P, ADAM3A</i>	-	++
<b>SM37.5</b>	8p23.3	2121198	2165888	44690	>1%	Comum	4	P	1,52E-23	-	-	++
<b>SM37</b>	10q11.22	46395963	46568696	172733	1%	Rara	14	P	9,20E-33	<i>GPRIN2, PPYR1, LOC728643</i>	-	++
<b>SM37.2</b>	11q11	55134286	55207505	73219	>1%	Comum	8	G	3,29E-10	<i>OR4P4, OR4S2, OR4C6</i>	-	++
<b>SM37.3</b>	11q14.1	81259541	81298056	38515	0	Rara	3	P	1,60E-10	-	-	++
<b>SM37.2</b>	12p13.31	9528390	9564066	35676	>1%	Comum	4	P	1,07E-21	-	-	++
<b>SM37.4</b>		9528390	9564066	35676	>1%	Comum	4	P	1,32E-23	-	-	++
<b>SM37</b>	13q14.3	49039910	49062297	22387	0	Nova rara	5	G	1,02E-20	<i>RCBTB1</i>	-	-
<b>SM37.3</b>		49039910	49062297	22387	0	Nova rara	5	G	2,39E-18	<i>RCBTB1</i>	-	-
<b>SM37.4</b>		49039910	49062297	22387	0	Nova rara	5	G	7,21E-17	<i>RCBTB1</i>	-	-
<b>SM37.3</b>	14q11.1 - q11.2	18798441	19497223	698782	>1%	Comum	14	P	3,37E-10	<i>P704P, OR4Q3, OR4M1, OR4N2, OR4K2, OR4K5, OR4K1</i>	-	++
<b>SM37.3</b>	14q24.3	73071204	73092218	21014	>1%	Comum	3	P	2,16E-13	<i>HEATR4, ACOT1</i>	-	++
<b>SM37</b>	14q32.33	105856772	105881877	25105	>1%	Comum	3	P	2,70E-14	-	-	++
<b>SM37.3</b>		105856772	105881877	25105	>1%	Comum	3	P	1,02E-19	-	-	++
<b>SM37.2</b>	15q11.2	18741516	19427550	686034	0	Rara	23	P	1,40E-31	<i>LOC727832, GOLGA8C, LOC646214, CXADRP2, POTE B</i>	-	++
<b>SM37.4</b>	15q11.2	18741516	20060261	1318745	>1%	Comum	46	P	4,91E-54	<i>LOC727832, GOLGA8C, LOC646214, CXADRP2, POTE B, LOC727924, OR4M2, OR4N4, LOC650137</i>	hsa-mir-1268	++

**Cont/ Tabela 23**

Casos	Região Cromossômica	Start	End	Tamanho (pb)	Grupo Controle	Tipo CNV	Nº Sondas	Evento	P valor	Genes	MicroRNAs	Nº CNVs
<b>SM37.3</b>	15q11.2	18692665	20060261	1367596	1%	Rara	47	P	1,90E-88	<i>LOC727832, GOLGA8C, LOC646214, CXADRP2, POTE8, LOC727924, OR4M2, OR4N4, LOC650137</i>	hsa-mir-1268	++
<b>SM37.2</b>	15q14	32523041	32578683	55642	1%	Rara	3	P	7,89E-37	-	-	++
<b>SM37</b>		32523041	32594400	71359	>1%	Comum	4	P	9,00E-15	-	-	++
<b>SM37.3</b>	15q14	32523041	32594400	71359	>1%	Comum	4	P	1,04E-63	-	-	++
<b>SM37.4</b>		32523041	32594400	71359	>1%	Comum	4	P	8,84E-71	-	-	++
<b>SM37</b>	16p11.2	32481109	33533640	1052531	>1%	Comum	18	P	1,60E-16	<i>LOC729355, TP53TG3, SLC6A10P, LOC729355, TP53TG3, LOC729355, TP53TG3</i>	-	++
<b>SM37.5</b>	22q11.23	22677759	22720395	42636	>1%	Comum	5	P	8,11E-53	<i>LOC391322, GSTT1, GSTTP2</i>	-	++

**Legenda.** \*a familiar SM37-2 apresentou a mesma CNV que a paciente SM37, porém o software não a reconheceu. P: perda genômica; G: ganho genômico; - ausente; + ≤3 CNVs descritas no DGV; ++ mais de 3 CNVs descritas no DGV.

**Tabela 24** - Alterações identificadas na paciente SM56 (câncer de mama aos 50 anos) e suas irmãs SM56-2 (câncer de endométrio aos 55 anos) e SM56-3 (sem história de câncer).

**Família SM56 (G1)**

Casos	Região Cromossômica	Start	End	Tamanho (pb)	Grupo Controle	Tipo CNV	Nº Sondas	Evento	P valor	Genes	MicroRNAs	Nº CNVs
<b>SM56.3</b>	1p31.1	72541243	72568209	26966	>1%	Comum	3	P	2,51E-12	-	-	++
<b>SM56</b>	3p12.3*	78990568	79028038	37470	0	Nova rara	4	P	5,29E-14	<i>ROBO1</i>	-	-
<b>SM56.2</b>		78990568	79028038	37470	0	Nova rara	4	P		<i>ROBO1</i>	-	-
<b>SM56.2</b>	3q26.1	163997028	164101976	104948	>1%	Comum	6	G	1,09E-29	-	-	++
<b>SM56.3</b>	3q29	196904149	196942358	38209	0	Rara	6	P	4,59E-15	<i>MUC20</i>	hsa-mir-570	++
<b>SM56</b>	6p11.2	57354689	57598026	243337	0	Rara	21	P	2,43E-20	<i>PRIM2</i>	-	++
<b>SM56.3</b>	11q11	55134286	55207505	73219	>1%	Comum	8	G	4,06E-20	<i>OR4P4, OR4S2, OR4C6</i>	-	++
<b>SM56</b>	12p13.31	9528390	9604833	76443	>1%	Comum	7	G	1,24E-23	-	-	++
<b>SM56.3</b>	14q11.1 - q11.2	18798441	19484213	685772	>1%	Comum	13	G	2,31E-26	<i>P704P, OR4Q3, OR4M1, OR4N2, OR4K2, OR4K5, OR4K1</i>	-	++
<b>SM56</b>	14q11.2	19377090	19484213	107123	0	Rara	8	G	1,90E-28	<i>OR4K2, OR4K5, OR4K1</i>	-	++
<b>SM56.3</b>	15q11.2	18692665	19882911	1190246	1%	Rara	31	G	5,89E-49	<i>LOC727832, GOLGA8C, LOC646214, CXADRP2, POTE8, LOC727924, OR4M2</i>	-	++
<b>SM56.3</b>	17q21.31	41527505	41653061	125556	0	Rara	11	G	3,13E-23	<i>KIAA1267</i>	-	++
<b>SM56</b>	17q21.31	41527505	41700962	173457	>1%	Comum	12	G	1,76E-31	<i>KIAA1267</i>	-	++

**Legenda.** \*a familiar SM56-2 apresentou a mesma CNV que a paciente SM56, porém o software não a reconheceu P: perda genômica; G: ganho genômico; - ausente; + ≤3 CNVs descritas no DGV; ++ mais de 3 CNVs descritas no DGV.

**Tabela 25** - Alterações identificadas na paciente SM83 (câncer de mama aos 35 anos) e seus familiares (SM83-2 e SM83-3 sem história de câncer).

<b>Família SM83 (G1)</b>												
Casos	Região Cromossômica	Start	End	Tamanho (pb)	Grupo Controle	Tipo CNV	Nº Sondas	Evento	P valor	Genes	MicroRNAs	Nº CNVs
<b>SM83</b>	1p31.1	72541243	72568209	26966	>1%	Comum	3	G	4,70E-32	-	-	++
<b>SM83.2</b>	1p31.1	72541243	72568209	26966	>1%	Comum	3	G	9,10E-32	-	-	++
<b>SM83</b>	3q26.1	163997028	164101976	104948	>1%	Comum	6	G	2,27E-17	-	-	++
<b>SM83</b>	4q34.1	173648289	173706608	58319	0	Rara	6	G	4,76E-15	<i>GALNTL6</i>	-	++
<b>SM83</b>	12p12.3	16293026	16594803	301777	0	Rara	18	G	1,64E-35	<i>MGST1, LMO3</i>	-	+
<b>SM83</b>	14q23.1	60588068	60606107	18039	0	Nova rara	3	G	3,54E-13	<i>SLC38A6</i>	-	-
<b>SM83.3</b>	22q11.23	22677759	22720395	42636	>1%	Comum	5	P	8,15E-25	<i>LOC391322, GSTT1, GSTTP2</i>	-	++

**Legenda.** P: perda genômica; G: ganho genômico; - ausente; + ≤3 CNVs descritas no DGV; ++ mais de 3 CNVs descritas no DGV.

**Tabela 26** - Alterações identificadas na paciente SM87 (câncer de mama e CCR aos 88 anos) e sua filha SM87-2 (câncer de mama aos 58 anos).

<b>Família SM87 (G2)</b>												
Casos	Região Cromossômica	Start	End	Tamanho (pb)	Grupo Controle	Tipo CNV	Nº Sondas	Evento	P valor	Genes	MicroRNAs	Nº CNVs
SM87	1p31.1	72541243	72568209	26966	>1%	Comum	3	P	3,05E-61	-	-	++
SM87.2		72541243	72568209	26966	>1%	Comum	3	P	1,14E-28	-	-	++
SM87	1q21.1	147308357	147510732	202375	>1%	Comum	15	P	5,35E-35	-	-	++
SM87.2		147308357	147510732	202375	>1%	Comum	15	P	1,21E-23	-	-	++
SM87	3p14.1	71124097	71233818	109721	0	Nova rara	9	G	6,46E-13	<i>FOXP1</i>	-	-
SM87	4p16.3	61352	107546	46194	0	Rara	4	G	2,27E-15	<i>ZNF595, ZNF718</i>	-	++
SM87	4q34.1	173687683	173706608	18925	0	Rara	3	G	2,09E-12	<i>GALNTL6</i>	-	+
SM87	6p11.2	57377759	57598026	220267	0	Rara	19	G	5,25E-18	<i>PRIM2</i>	-	++
SM87	6p21.32	32587805	32630048	42243	>1%	Comum	3	P	5,26E-56	<i>HLA-DRB5, HLA-DRB6</i>	-	++
SM87	7q31.31	120298740	120426730	127990	0	Rara	12	G	1,17E-15	<i>ING3, C7orf58</i>	-	+
SM87.2	8p11.23	39356395	39494087	137692	>1%	Comum	12	G	3,66E-13	<i>ADAM5P, ADAM3A</i>	-	++
SM87.2	10q26.3	135103829	135227663	123834	1%	Rara	11	G	1,14E-27	<i>LOC619207, CYP2E1, SYCE1</i>	-	++
SM87	11p11.2	46965179	46988641	23462	0	Nova rara	3	G	2,01E-13	<i>C11orf49</i>	-	-
SM87	11q11	55134286	55207505	73219	>1%	Comum	8	G	9,02E-13	<i>OR4P4, OR4S2, OR4C6</i>	-	++
SM87.2	12p13.31	9528390	9564066	35676	>1%	Comum	4	P	1,27E-30	-	-	++
SM87	12q24.33	130299107	130381490	82383	0	Rara	6	P	1,09E-37	-	-	++
SM87.2		130299107	130381490	82383	0	Rara	6	P	2,41E-15	-	-	++
SM87	14q32.33	105856772	105881877	25105	>1%	Comum	3	G	3,24E-13	-	-	++
SM87	14q32.33	105602402	105630289	27887	>1%	Comum	3	P	6,48E-58	-	-	++

**Cont/ Tabela 26**

Casos	Região Cromossômica	Start	End	Tamanho (pb)	Grupo Controle	Tipo CNV	Nº Sondas	Evento	P valor	Genes	MicroRNAs	Nº CNVs
<b>SM87.2</b>	15q11.2	18450362	20060261	1609899	1%	Rara	48	G	1,19E-36	<i>LOC727832, GOLGA8C, LOC646214, CXADRP2, POTE8, LOC727924, OR4M2, OR4N4, LOC650137</i>	hsa-mir-1268	++
<b>SM87</b>	15q11.2	18692665	20336087	1643422	0	Rara	49	G	3,40E-67	<i>LOC727832, GOLGA8C, LOC646214, CXADRP2, POTE8, LOC727924, OR4M2, OR4N4, LOC650137, GOLGA8D, LOC283767</i>	hsa-mir-1268	++
<b>SM87</b>	15q21.3	54497983	54513771	15788	0	Rara	3	G	7,71E-15	<i>TEX9, MNS1</i>	-	++
<b>SM87</b>	15q26.1	89111000	89147948	36948	0	Nova rara	5	G	3,70E-12	<i>BLM</i>	-	-
<b>SM87</b>	16p11.2 - p11.1	34309887	34584993	275106	0	Rara	10	G	1,49E-14	<i>LOC283914, LOC146481</i>	-	++
<b>SM87.2</b>	17q21.31	41527505	41625590	98085	0	Rara	9	G	1,22E-12	<i>KIAA1267</i>	-	++
<b>SM87</b>	17q25.1	71478161	71511523	33362	0	Nova rara	3	G	8,68E-15	<i>ACOX1, LOC100134934, CDK3</i>	-	-
<b>SM87.2</b>	22q11.23	22677759	22720395	42636	>1%	Comum	5	P	1,13E-57	<i>LOC391322, GSTT1, GSTTP2</i>	-	++
<b>SM87</b>	22q13.1	37688858	37715585	26727	>1%	Comum	3	P	3,36E-13	<i>APOBEC3A, APOBEC3B</i>	-	++
<b>SM87.2</b>		37688858	37715585	26727	>1%	Comum	3	P	3,89E-10	<i>APOBEC3A, APOBEC3B</i>	-	++
<b>SM87</b>	Xp21.3	26674328	26777592	103264	0	Rara	4	G	1,10E-15	-	-	+
<b>SM87</b>	Xq13.1	71348690	71391442	42752	0	Nova rara	3	G	5,41E-14	<i>ERCC6L</i>	-	-
<b>SM87</b>	Xq22.2	102927098	102980861	53763	0	Rara	6	G	3,49E-13	<i>PLP1, RAB9B</i>	-	+

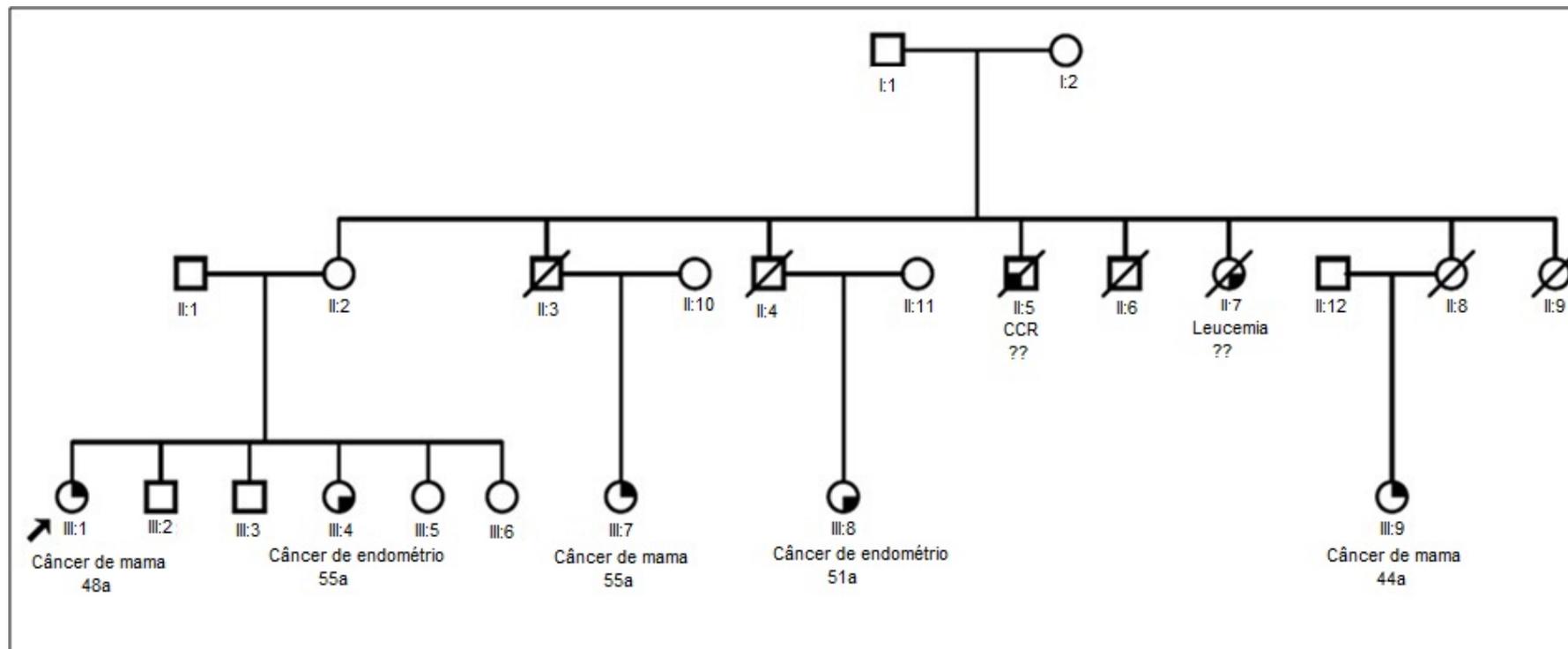
**Legenda.** P: perda genômica; G: ganho genômico; - ausente; + ≤3 CNVs descritas no DGV; ++ mais de 3 CNVs descritas no DGV.

### 4.3 ANÁLISE EM FAMÍLIAS EPECÍFICAS

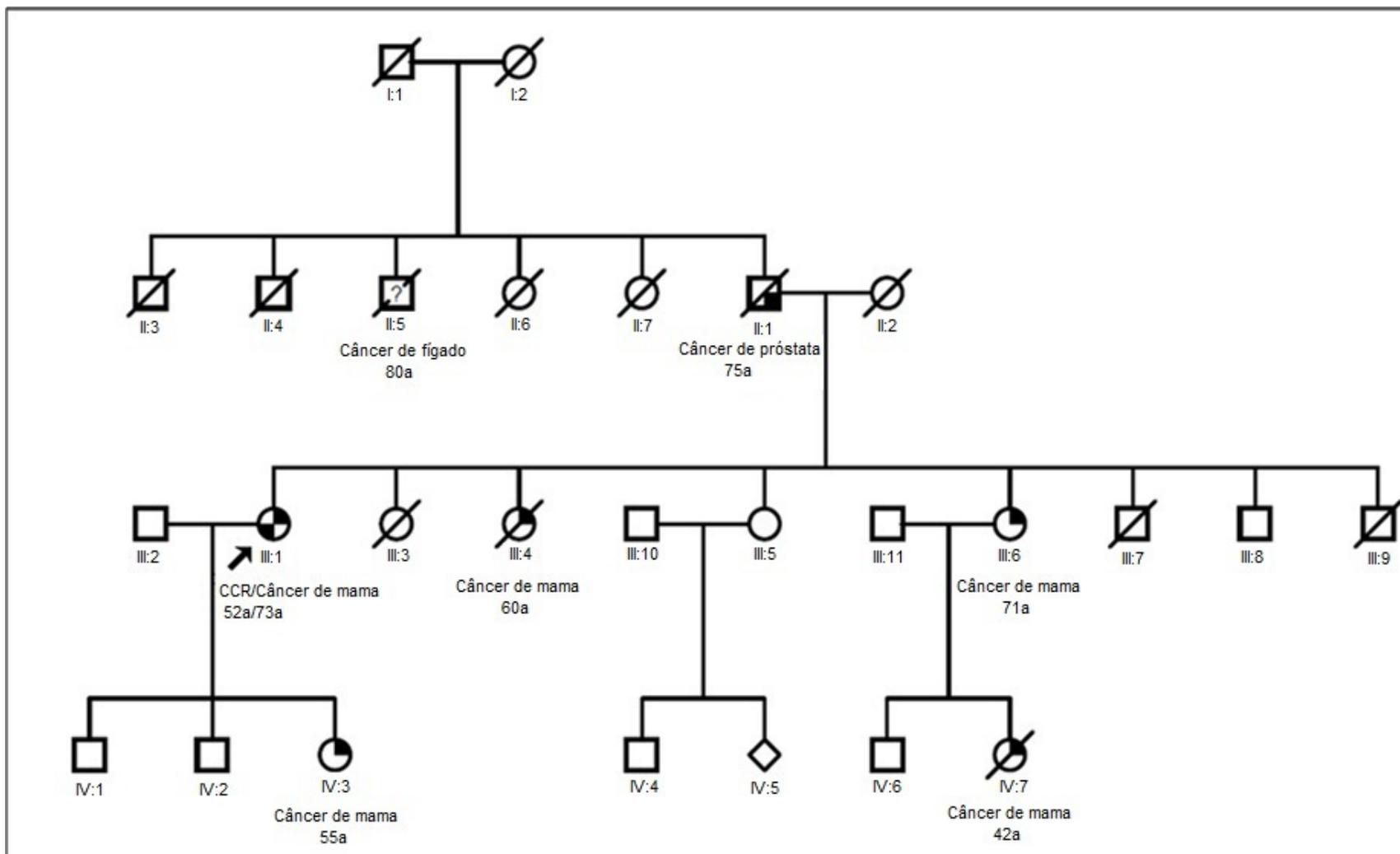
#### 4.3.1 Família SM56 (Grupo 1) e SM37 (Grupo 2)

A CNV nova rara, detectada como deleção no gene *ROBO1* (3p12.3) foi idêntica em duas pacientes de diferentes famílias não relacionadas: SM56 (grupo 1) e SM37 (grupo 2). Dois familiares destes dois pacientes, SM56.2 (III:4; câncer de endométrio aos 55 anos) e SM37.2 (IV:3; câncer de mama aos 55 anos), apresentaram a mesma perda genômica. As duas famílias preenchem os critérios da Síndrome de Mama-Cólon, SMC2 (paciente SM56) e SMC1 (paciente SM37), descrito no item 3.1 da seção Material e Métodos.

A paciente SM56 foi diagnosticada com câncer de mama aos 48 anos e apresentou história familiar de câncer (Figura 17). Entre as parentes convocadas para o estudo, apenas a irmã, SM56.2, apresentou câncer de endométrio aos 55 anos de idade. A probanda SM37 foi diagnosticada com câncer colorretal aos 52 anos e câncer de mama aos 73 anos de idade. Entre os familiares que participaram do estudo, apenas a filha, SM37.2, apresentou câncer de mama aos 55 anos de idade (Figura 18).



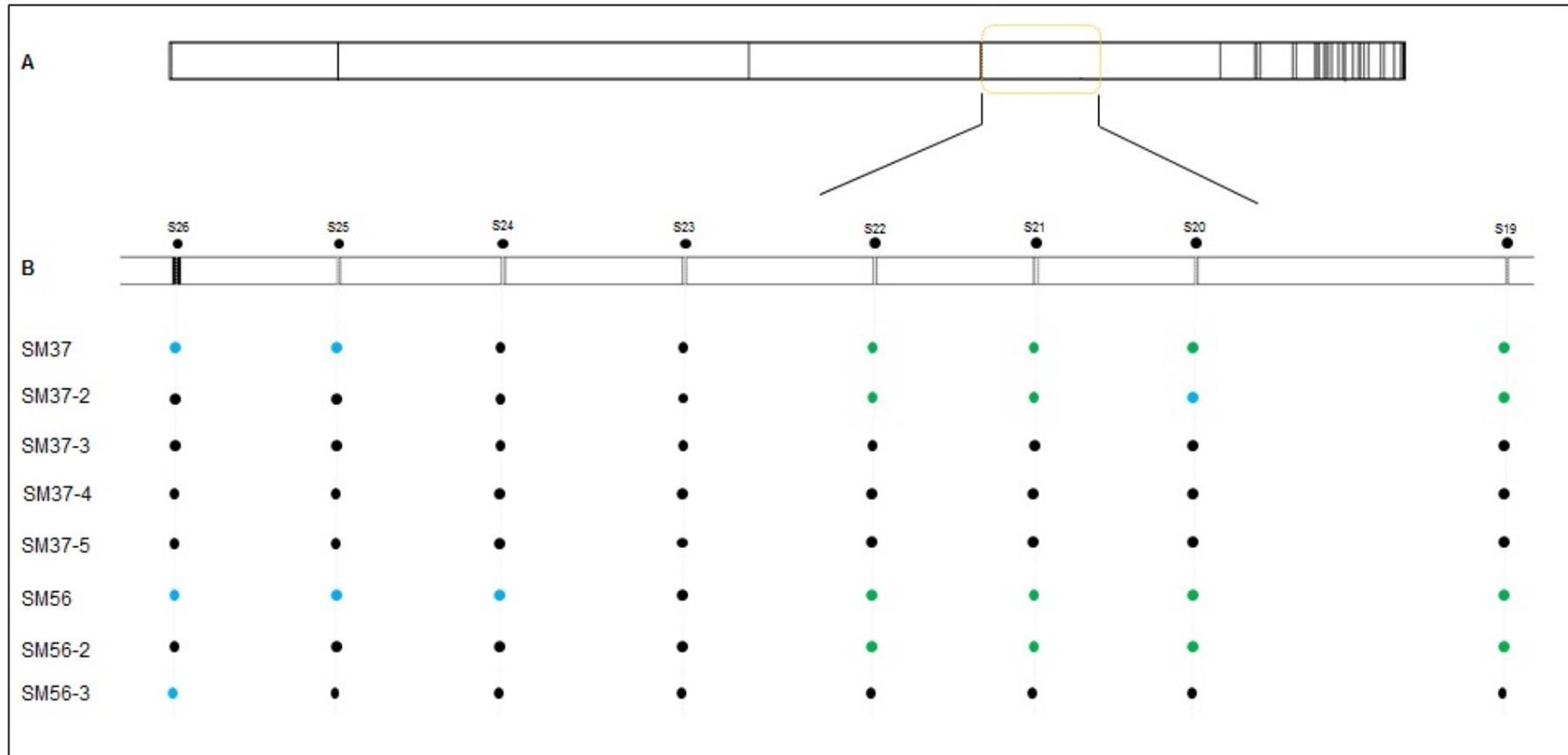
**Figura 17** - Heredograma do caso SM56. A probanda do estudo (III:1, seta) apresentou câncer de mama (48 anos); a irmã (III:4), SM56.2, apresentou câncer de endométrio aos 55 anos. A irmã, SM56.3 (III:6), não tem história pessoal de câncer.



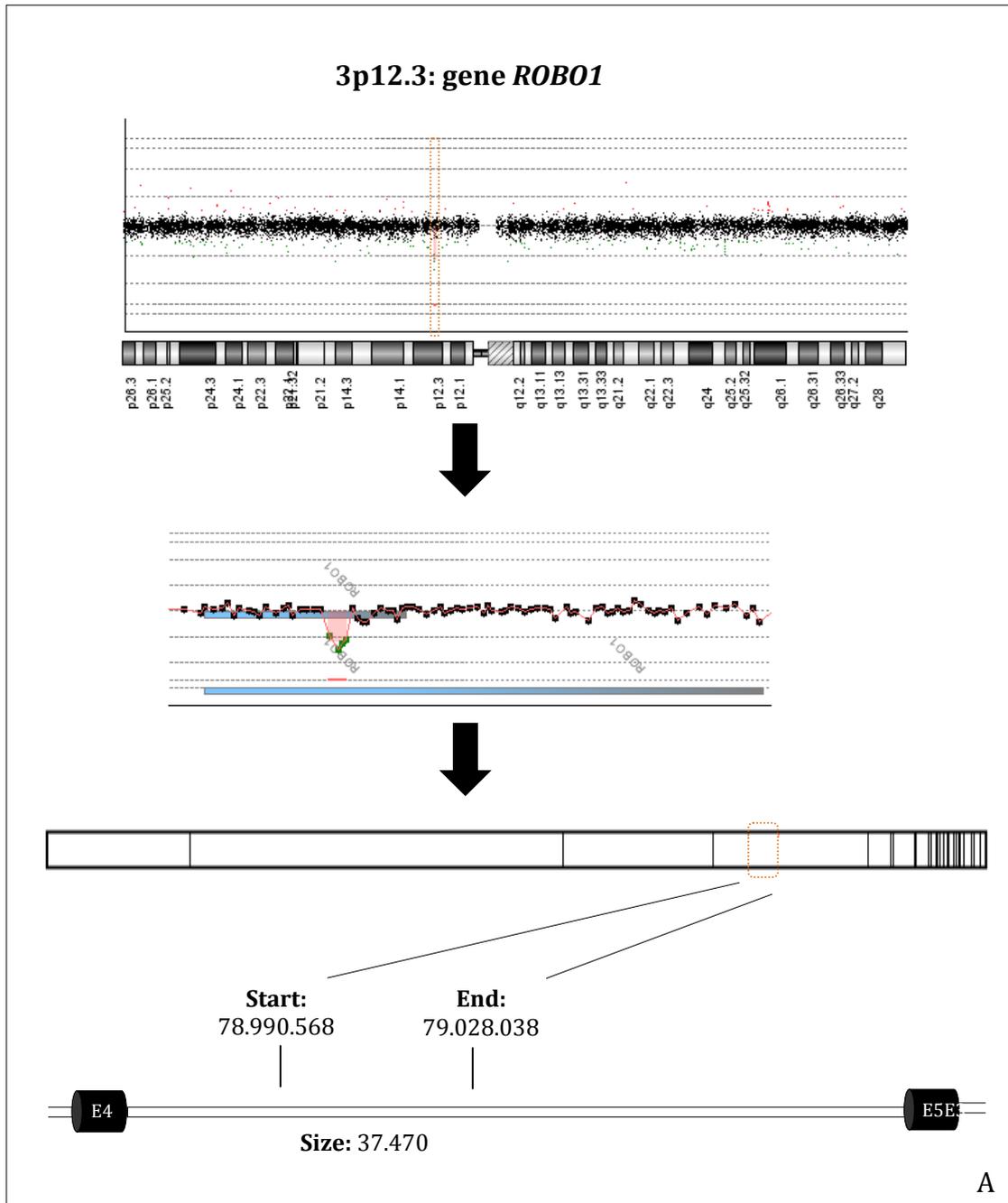
**Figura 18** - Heredograma do caso SM37. A probanda do estudo (III:1) apresentou câncer de mama (52 anos) e colorretal (73 anos); a filha (IV:3), SM37.2, apresentou câncer de mama aos 55 anos. Os filhos, SM37.3 (IV:1) e SM37.4 (IV:2), e irmão, SM37.5 (III:8), não possuem histórico pessoal de câncer.

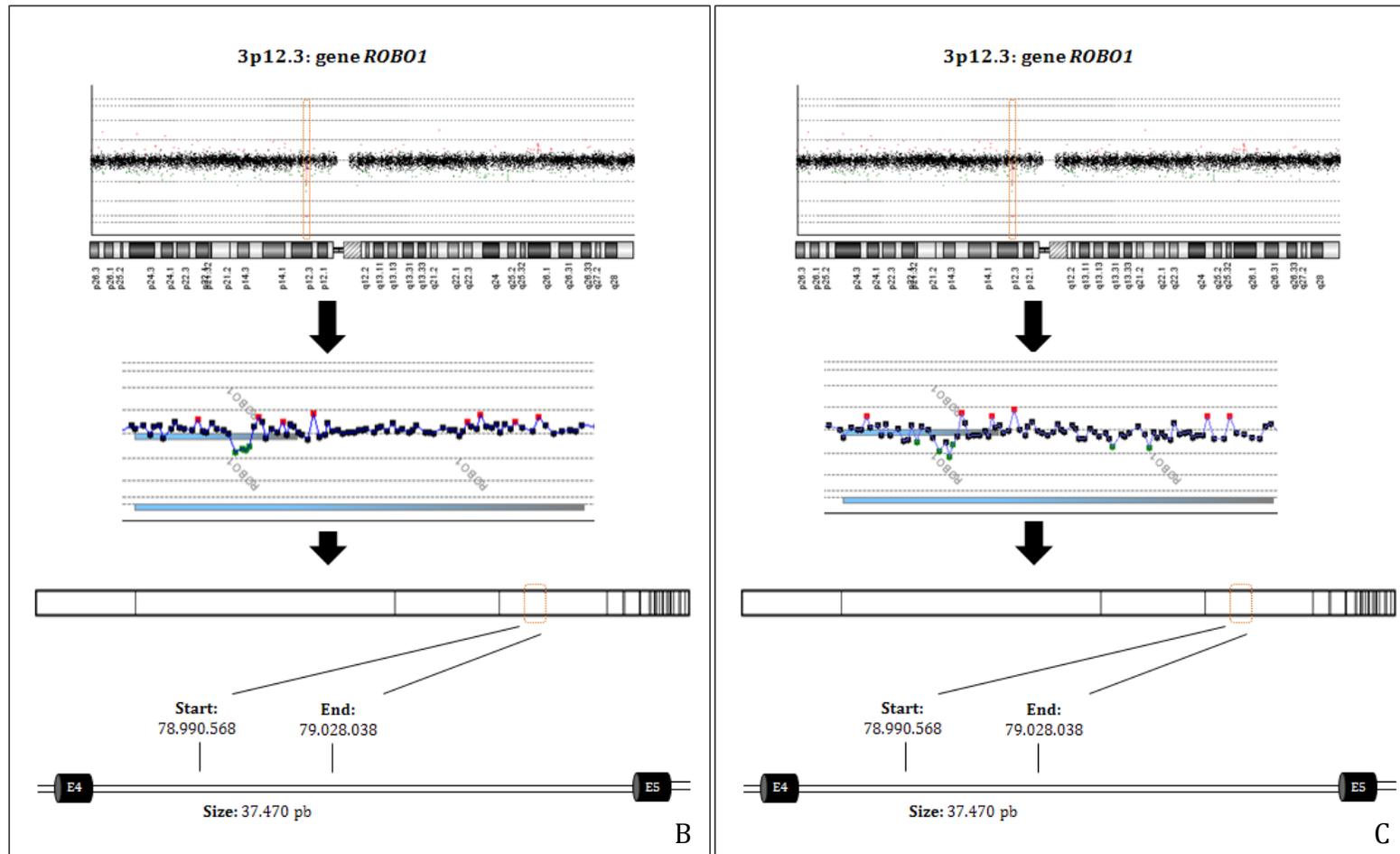
A plataforma de 4x180K (Agilent Technologies) possui 76 sondas correspondentes ao gene *ROBO1*, sendo sete mapeadas em regiões exônicas e as demais em regiões intrônicas. Com os parâmetros utilizados, foram identificadas quatro sondas intrônicas envolvidas em perdas genômicas. A Figura 19 ilustra o gene *ROBO1* e as sondas mapeadas tanto na região da perda genômica (íntron 4-5) como as sondas próximas à alteração (éxon 4). Nesta figura, é possível identificar as sondas normais (círculos pretos), as sondas alteradas (círculos verdes) e as sondas com log menor que -0,30 (círculos azuis) em todos os pacientes e parentes envolvidos nessa alteração. As sondas em azul, não registradas como envolvidas em perdas (*Software DNA Analytics*, Agilent Technologies), possuem uma intensidade de sinal igual a das sondas alteradas. Assim, estas regiões seriam alvos para validação e avaliação de perdas.

A perda genômica envolvendo o gene *ROBO1* identificada nos probandos e seus familiares apresentou o mesmo tamanho (37.470 pb) e compreendeu as mesmas sequências (Figura 20). Porém, a alteração identificada em SM37.2 (IV:3) não foi considerada significativa por apresentar um número menor de sondas alteradas consecutivas do que o mínimo considerado como significativo (acima de três sondas consecutivas). Apesar de apresentar um número menor de sondas alteradas, a sonda S20, considerada normal, apresentou um log de -0,48, sugestivo de perda.



**Figura 19** - Representação esquemática das sondas mapeadas na região envolvida em perda genômica e na região exônica mais próxima à alteração. **A.** Esquema do gene *ROBO1*. O retângulo em laranja representa a perda genômica identificada no intron 4-5, a partir da reação de aCGH, e o éxon mais próximo dessa alteração. **B.** Esquema das oito sondas mapeadas nessa região. Os círculos em verde representam as sondas com deleção, gerados pelo software *DNA analytics*, em azul são as sondas com o valor de log menor que -0,30 e em preto, são as sondas normais.





**Figura 20** - Representação esquemática da deleção do gene *ROBO1* em 3p12.3 envolvendo a região intrônica 4-5. **A.** Deleção identificada nas pacientes SM56 (grupo 1) e SM37 (grupo 2). **B.** Deleção identificada na familiar SM56-2. **C.** Deleção identificada na familiar SM37-2.

Após a identificação, por CGH *array*, da CNV nova rara, mapeada em 3p12.3 envolvendo o gene *ROBO1*, foram realizados experimentos de sequenciamento direto, para avaliar a presença de mutações, de qPCR, para confirmar e verificar a extensão da deleção, de bioinformática, para confirmar a perda do sítio de *splice* do éxon 4 e imunistoquímica, para verificar a expressão da proteína ROBO1 nos tecidos tumorais de mama e colorretal em pacientes com história familiar de câncer.

#### **a. Sequenciamento gene *ROBO1***

O gene *ROBO1* foi dividido em 26 fragmentos correspondentes aos 31 éxons e junções íntrons-éxons. A reação de sequenciamento foi realizada nos casos SM56 e SM37 e em seis familiares, dois da paciente SM56 (SM56.2 e SM56.3) e quatro da paciente SM37 (SM37.2, SM37.3, SM37.4, SM37.5). Tanto as pacientes SM37 e SM56 como os familiares da SM56 não apresentaram mutações.

Foram identificadas três mutações silenciosas, sem troca de aminoácidos, envolvendo o gene *ROBO1* apenas nos familiares da paciente SM37. Todos os parentes do caso SM37 (SM37.2, SM37.3, SM37.4, SM37.5) apresentaram a alteração identificada no éxon 13, posição 1739, envolvendo a troca da base guanina pela adenina. Dois destes parentes, SM37.2 e SM37.3 apresentaram também a alteração no éxon 16, posição 2210, envolvendo a troca da base adenina por timina. Em adição, os outros dois parentes da paciente SM37, SM37.4 e SM37.5, apresentaram a alteração no éxon 19, posição 2792, envolvendo a troca da base citosina por

adenina. Desta forma, os casos SM37.2 e SM37.3 apresentaram duas alterações no gene *ROBO1* envolvendo os exons 13 e 16 enquanto os casos SM37.4 e SM37.5 apresentaram duas alterações nos exons 13 e 19 (Tabela 27, Figura 21).

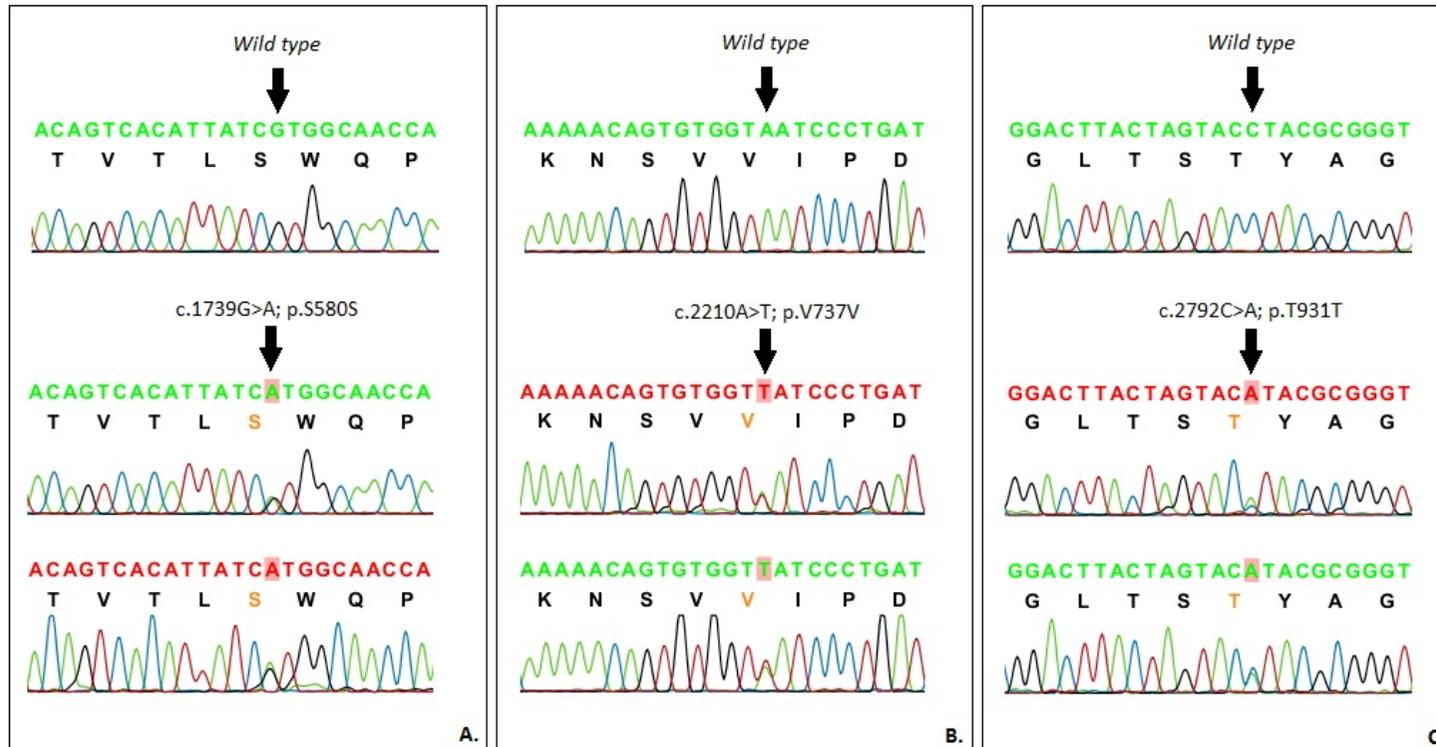
**Tabela 27** - Mutações silenciosas identificadas nos familiares da paciente alvo SM37.

Casos	Éxon	Alteração	Tipo
SM37.2, SM37.3, SM37.4, SM37.5	13	c.1739G>A; p.S580S	Silenciosa
SM37.2, SM37.3	16	c.2210A>T; p.V737V	Silenciosa
SM37.4, SM37.5	19	c.2792C>A; p.T931T	Silenciosa

Apesar de apresentarem as mesmas mutações silenciosas e não patogênicas, os indivíduos SM37.2 e SM37.3 não possuem semelhanças clínicas (como história pessoal de câncer) nem moleculares (quantidade de CNVs (Tabela 28). O mesmo ocorre entre os indivíduos SM37.4 e SM37.5 (Tabela 28).

**Tabela 28** - Comparação entre os dados clínicos e moleculares e os familiares da paciente SM37, que apresentaram mais de uma mutação silenciosa e não patogênica no *ROBO1*.

Éxons Mutados	Casos	Parentesco com SM37	Número de CNVs	História de câncer
13 e 16	SM37.2	Filha	8	Mama (55 anos)
	SM37.3	Filho	14	-
13 e 19	SM37.4	Filho	10	-
	SM37.5	Irmão	5	-



**Figura 21** - Representação gráfica das mutações identificadas no gene *ROBO1*. A. SM37.2, SM37.3, SM37.4, SM37.5: mutação silenciosa. B. SM37.4, SM37.5: mutação silenciosa. C. SM37.4, SM37.5: mutação silenciosa.

## b. qPCR

Com o objetivo de confirmar as perdas genômicas envolvendo o gene *ROBO1* detectado nos probandos SM56 e SM37 e seus familiares, SM56.2 e SM37.2 foi utilizada a técnica de qPCR. Foram construídos dois pares de iniciadores: (P1) flanqueando a sonda S20 mapeada no íntron 4-5 e envolvida na deleção identificada no CGH *array* e (P2) englobando a sonda S26 mapeada no éxon 4, o mais próximo a deleção. A reação foi realizada nos casos SM56 e SM37 e em quatro familiares da paciente SM37 (SM37.2, SM37.3, SM37.4, SM37.5).

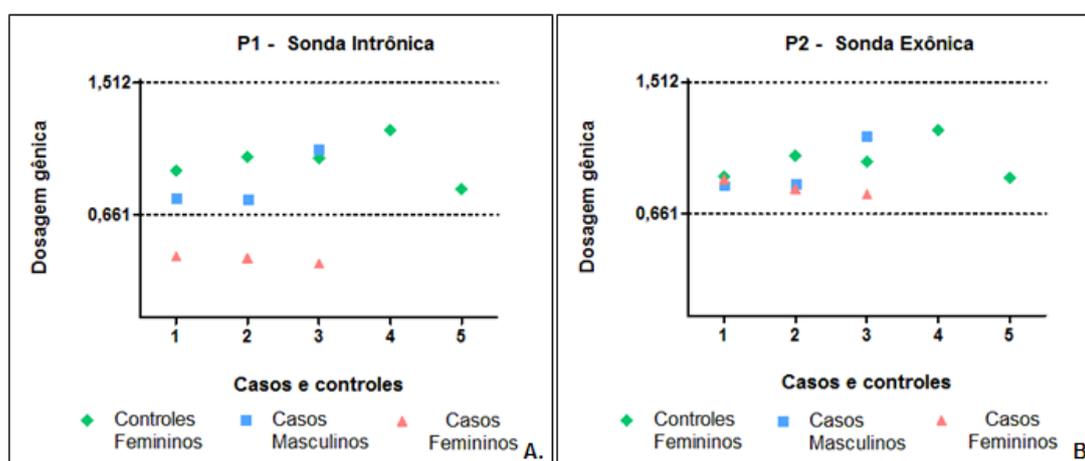
As eficiências da PCR para os genes endógenos *HPRT* e *GAPDH* foi de 2,03 e 2,18 respectivamente. Para o gene alvo *ROBO1*, as eficiências foram 2,04 (iniciador 1) e 2,02 (iniciador 2), respectivamente.

A quantidade do número de cópias do gene *ROBO1* foi calculada a partir da relação entre o gene *HPRT* e *GAPDH*, uma vez que o *HPRT* está localizado no cromossomo X (Xq26.1) e o *GAPDH*, no cromossomo 12 (12p13). Com isso, mulheres apresentam duas cópias de cada gene e homens, uma cópia do *HPRT* e duas cópias do *GAPDH*. Dessa maneira, os intervalos para a dosagem gênica foi: perda, abaixo de 0,661; normal, entre 0,689 e 1,451 e ganhos, acima de 1,512 (Tabela 29).

**Tabela 29** - Cálculo do intervalo da dosagem gênica, a partir da relação entre os genes *HPRT* e *GAPDH*.

	Sexo	Nº Cópias	Evento	Intervalo Observado
$2^{-(\Delta Ct)}_{HPRT}/2^{-(\Delta Ct)}_{GAPDH}$	XY	1/2	Perda	<0,661
$2^{-(\Delta Ct)}_{HPRT}/2^{-(\Delta Ct)}_{GAPDH}$	XX	2/2	Normal	0,689-1,451
$2^{-(\Delta Ct)}_{GAPDH}/2^{-(\Delta Ct)}_{HPRT}$	XY	2/1	Ganho	>1,512
$2^{-(\Delta Ct)}_{GAPDH}/2^{-(\Delta Ct)}_{HPRT}$	XX	2/2	Normal	0,689-1,451

Após a normalização das amostras, observou-se que para o iniciador 1, as pacientes SM56 e SM37 e a parente SM37.2 apresentaram uma cópia do gene *ROBO1*, com intervalo entre 0,347 a 0,393. Já os controles e casos masculinos apresentaram duas cópias do gene, com intervalo entre 0,764 a 1,206. Para o iniciador 2, todos os casos (femininos e masculinos) e controles apresentaram duas cópias do gene *ROBO1* (intervalo entre 0,787 a 1,201) (Figura 22).

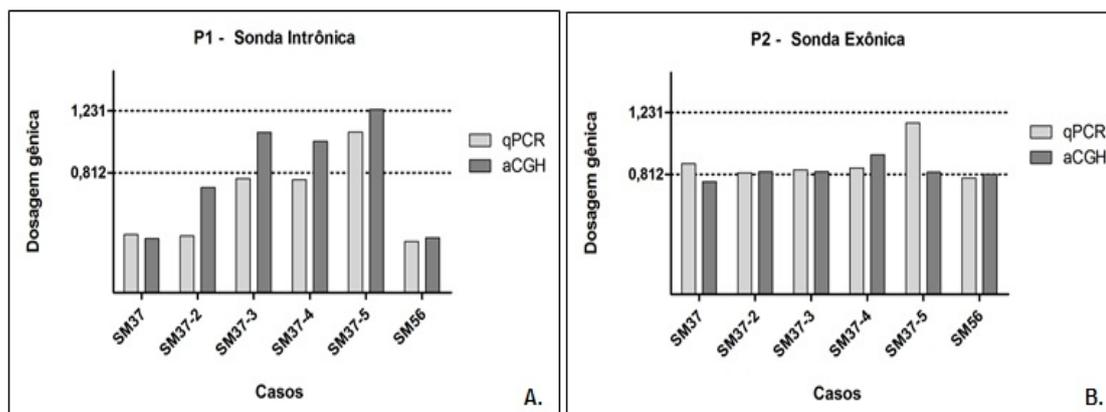


**Figura 22** - Análise gráfica dos resultados obtidos na qPCR. **A.** Par de iniciador 1. **B.** Par de iniciador 2. As linhas tracejadas representam o limite de perda ( $\leq 0,661$ ) e de ganho genômico ( $\geq 1,512$ ). O intervalo entre as linhas representa a normalidade, ou seja, duas cópias do gene *ROBO1*.

Em seguida, foi realizada a comparação dos resultados da quantificação do gene *ROBO1* pela qPCR com a intensidade de sinal obtida na reação de aCGH. Nessa comparação observou-se que para o iniciador 1, apenas as pacientes SM56, SM37 e SM37.2 apresentaram perda de uma cópia do gene *ROBO1*. E para o iniciador 2, todas as amostras apresentaram duas cópias do gene (Tabela 30 e Figura 23).

**Tabela 30** - Comparação entre a intensidade de sinal obtida nas metodologias de CGH *array* e qPCR.

Casos	Intensidade Sinal (Iniciadores 1)				Intensidade Sinal (Iniciadores 2)			
	qPCR	Evento	aCGH	Evento	qPCR	Evento	aCGH	Evento
	<b>SM37</b>	0,393	Perda	0,435	Perda	0,885	Normal	0,763
<b>SM37.2</b>	0,383	Perda	0,446	Perda	0,823	Normal	0,830	Normal
<b>SM37.3</b>	0,772	Normal	0,912	Normal	0,843	Normal	0,830	Normal
<b>SM37.4</b>	0,764	Normal	0,962	Normal	0,856	Normal	0,945	Normal
<b>SM37.5</b>	1,087	Normal	0,980	Normal	1,161	Normal	0,827	Normal
<b>SM56</b>	0,347	Perda	0,548	Perda	0,787	Normal	0,812	Normal



**Figura 23** - Análise gráfica dos resultados obtidos por CGH *array* e qPCR. **A.** Par de iniciador 1. **B.** Par de iniciador 2. As barras indicam as intensidades de sinal obtidas nas duas metodologias. As linhas tracejadas representam o limite de perda e ganho genômico utilizado na CGH *array*,  $\log_2 -0,30 = 0,812$  e  $\log_2 +0,30 = 1,231$ , respectivamente.

Para o mapeamento da deleção do gene *ROBO1*, foram construídos seis pares de iniciadores ao longo do éxon 4. Os iniciadores englobam regiões intrônicas (anterior e posterior ao éxon 4), exônica e de sítio de *splice* (Figura 36). Esse experimento foi realizado nos casos SM56 e SM37 e em seis familiares, sendo dois da paciente SM56 (SM56.2 e SM56.3) e quatro da SM37 (SM37.2, SM37.3, SM37.4 e SM37.5).

Para o cálculo da eficiência, as reações foram realizadas triplicata em duas placas de 96 poços: (1) contendo os genes endógenos (*HPRT* e *GAPDH*) e três iniciadores do gene alvo (P1, P2 e P3) e (2) contendo os mesmos genes endógenos e outros três iniciadores para o gene alvo (P4, P5 e P6). A eficiência da PCR para os genes endógenos e alvo estão descritos na Tabela 31.

**Tabela 31** - Resultados da eficiência dos genes endógenos e alvo na qPCR.

Placa 1		Placa 2	
Gene	Eficiência	Gene	Eficiência
<b>Endógenos</b>		<b>Endógenos</b>	
<i>HPRT</i>	2,03	<i>HPRT</i>	2,02
<i>GAPDH</i>	1,98	<i>GAPDH</i>	2,01
<b>Alvo</b>		<b>Alvo</b>	
P1	2,07	P4	2,01
P2	1,98	P5	2,02
P3	1,99	P6	2,06

Para essa análise, foi utilizado o mesmo cálculo de relação entre o gene *HPRT* e *GAPDH* para obtenção dos intervalos de dosagem gênica. Para perda, o intervalo foi abaixo de 0,816; normal, entre 0,870 e 1,031 e ganhos, acima de 1,210.

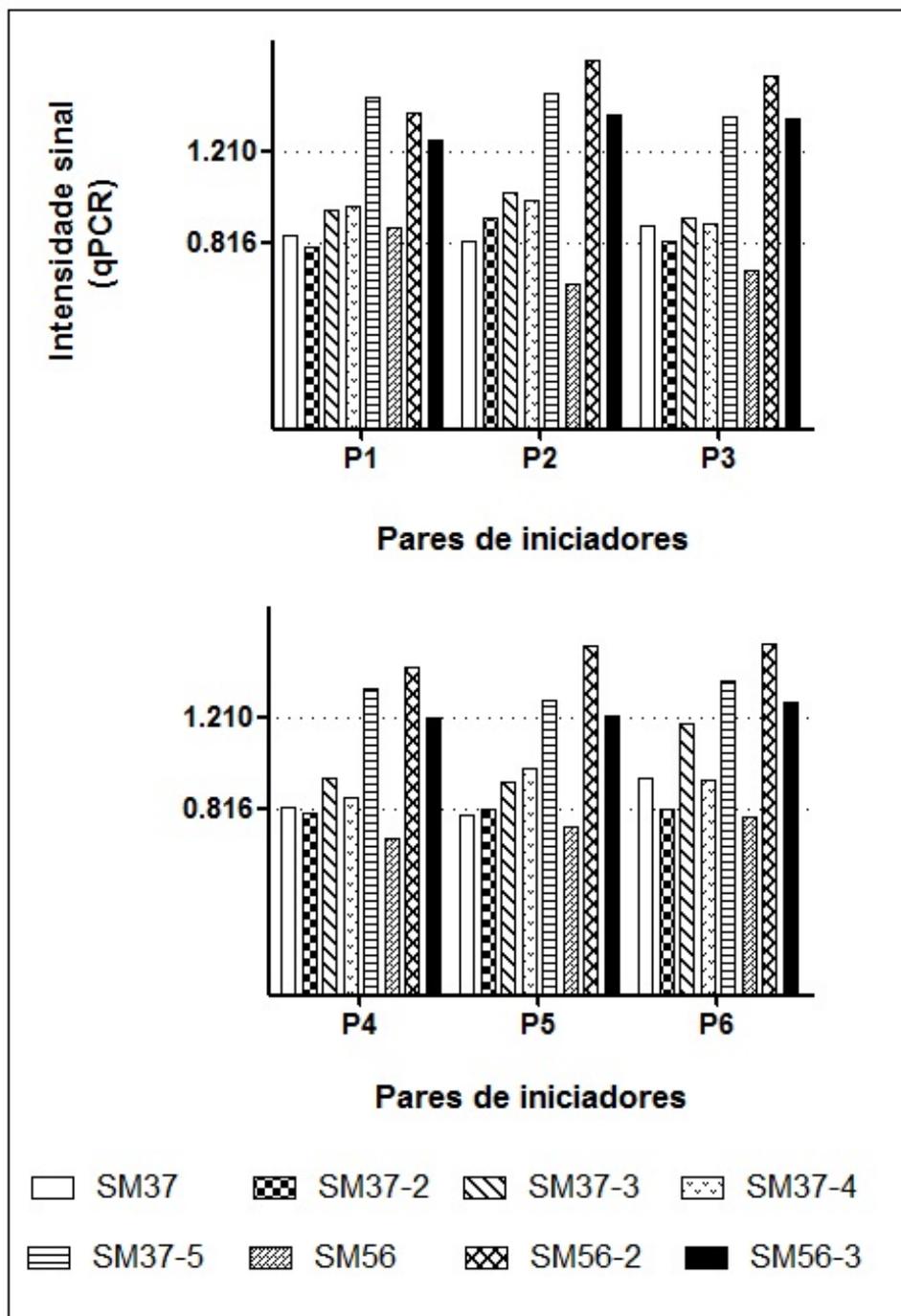
Após a normalização das amostras, observou-se uma intensidade de sinal mínima e máxima de 0,820 (iniciador 2) e 1,158 (iniciador 6), respectivamente, entre os controles femininos. Nos controles masculinos, a intensidade foi de 0,689 (iniciador 6) e 1,180 (iniciadores 2 e 4). A partir desses resultados, verificou-se que todos os controles apresentaram número de cópias do gene *ROBO1* dentro da normalidade. Com exceção do controle masculino CL36, que apresentou intensidade de sinal abaixo do valor normal para o iniciador 6.

Todos os casos masculinos apresentaram dosagem gênica dentro do intervalo de normalidade. Por outro lado, os casos femininos SM37, SM37.2 e SM56) apresentaram perda no número de cópias do gene *ROBO1* na região de *splice* entre o éxon 4 e o íntron 4-5, representada pelos pares de iniciadores 5 e 6 (P5 e P6). Na Tabela 32 estão descritas as intensidades de sinal de todos os casos segundo cada iniciador avaliado. A Figura 24

representa uma comparação em barras das intensidades de cada iniciador identificada em cada paciente.

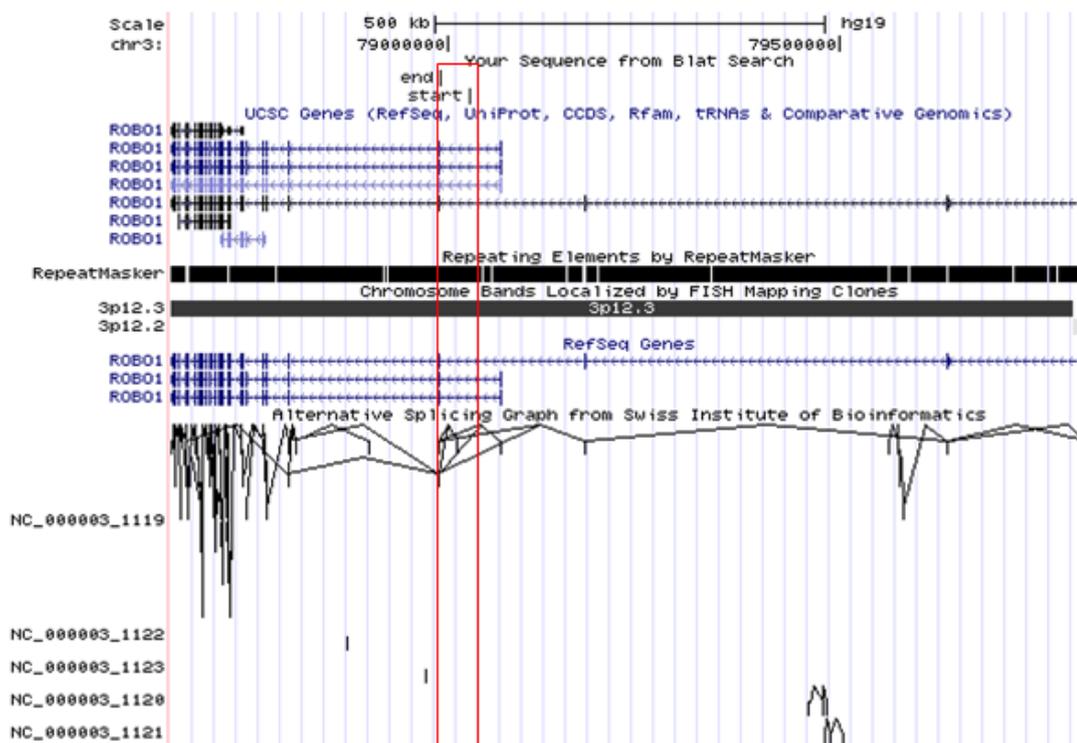
**Tabela 32** - Intensidades de sinal obtida na metodologia de qPCR em todos os casos e em cada par de iniciador.

<b>Casos</b>	<b>P1</b>	<b>P2</b>	<b>P3</b>	<b>P4</b>	<b>P5</b>	<b>P6</b>
<b>Femininos</b>						
SM37	0,846	0,825	0,891	0,822	0,788	0,948
SM37.2	0,799	0,922	0,825	0,795	0,817	0,811
SM56	0,880	0,638	0,697	0,683	0,735	0,780
SM56.2	1,386	1,608	1,540	1,431	1,531	1,537
SM56.3	1,261	1,374	1,357	1,211	1,219	1,282
<b>Masculinos</b>						
SM37.3	0,954	1,038	0,925	0,947	0,932	1,184
SM37.4	0,975	0,998	0,895	0,863	0,991	0,944
SM37.5	1,449	1,469	1,268	1,339	1,291	1,377



**Figura 24** - Análise gráfica dos resultados obtidos na qPCR. As barras indicam as intensidades de sinal obtidas em cada par de iniciadores. As linhas tracejadas representam o limite de perda e ganho genômico, 0,816 e 1,210, respectivamente.

Após a caracterização da extensão da deleção identificada no CGH array, foi possível verificar o envolvimento do sítio de *splice* do éxon 4 na deleção. A partir desse dado, realizou-se uma análise de bioinformática utilizando o site de bioinformática *UCSC Genome Bioinformatics* (<http://genome.ucsc.edu/>) para verificar se essa região está envolvida em *splicing*. A Figura 25 ilustra o resultado dessa análise, demonstrando que a região do éxon 4 e íntron 4-5 é uma região de *splicing* alternativo.



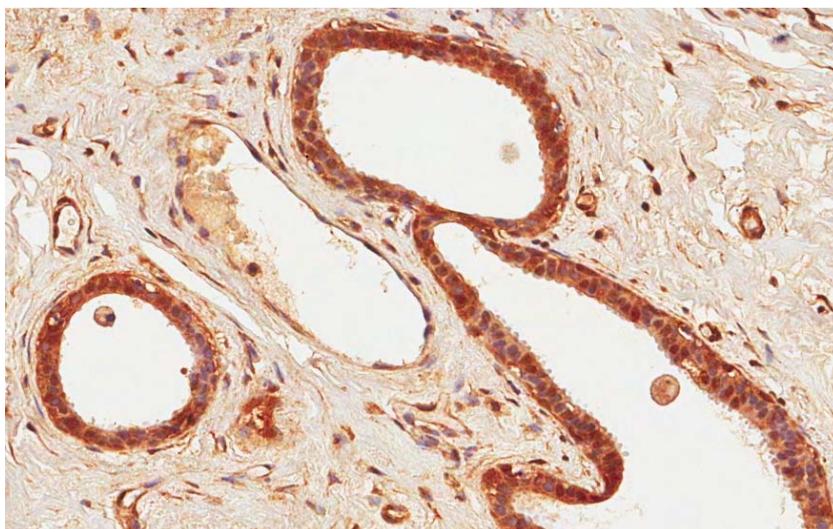
**Figura 25** - Representação gráfica de *splicing* alternativo envolvendo o éxon 4 do gene *ROBO1*, a partir da análise de bioinformática realizada no site UCSC. O retângulo em vermelho ilustra a região de começo e fim da alteração identificada no CGH array envolvida em *splicing* alternativo.

### c. Análise da expressão da proteína ROBO1

#### Tecido normal da paciente SM37

A avaliação da expressão da proteína ROBO1 foi realizada em tecido normal adjacente ao carcinoma lobular de mama da paciente SM37 para verificar a intensidade de marcação em tecidos normais de mama.

De acordo com a Figura 26, o tecido normal apresentou imunomarcação citoplasmática intensa.



**Figura 26** - Marcação citoplasmática forte da proteína ROBO1 em tecido normal de mama.

#### TMA de carcinoma mamário

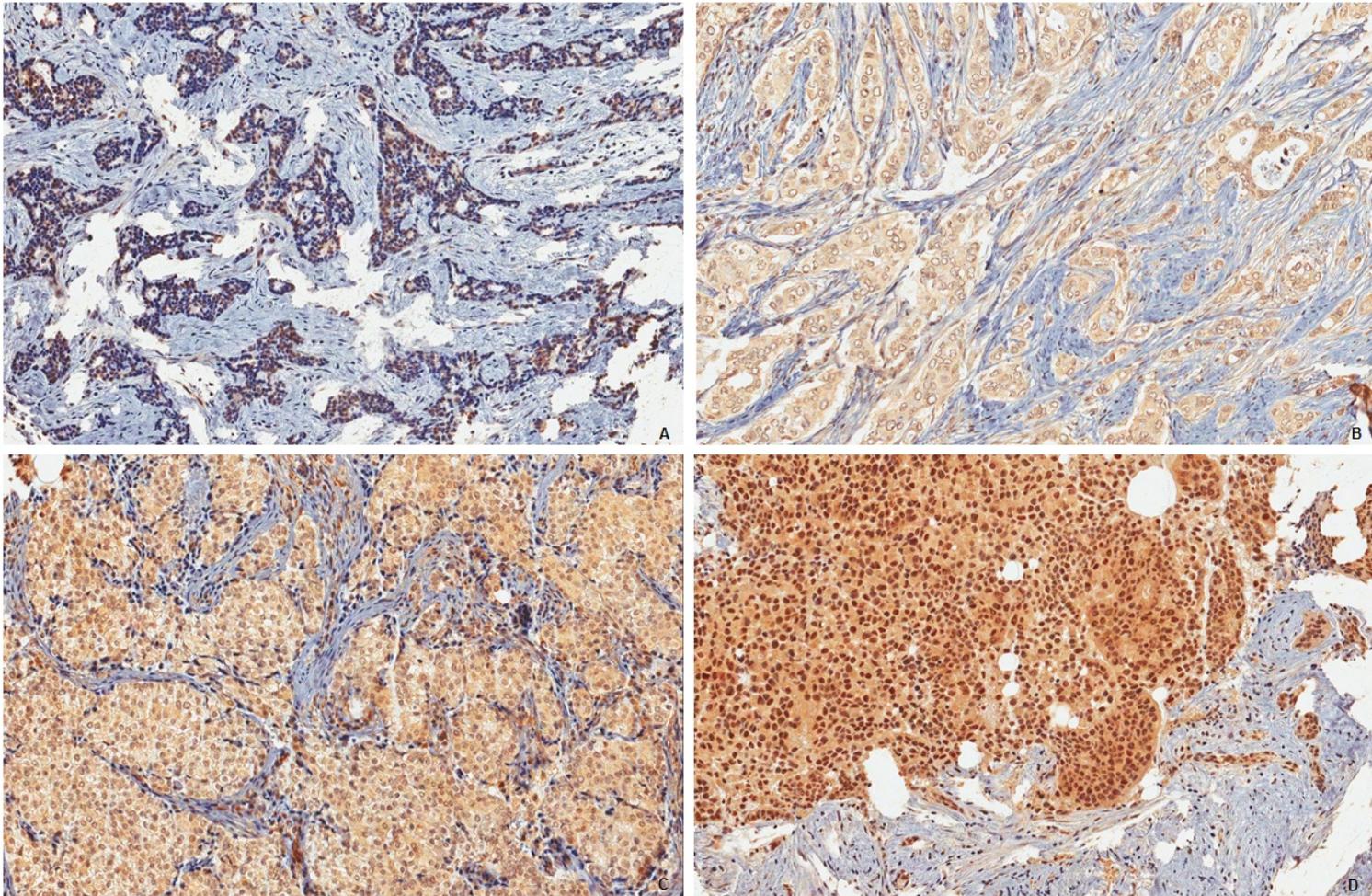
Entre os 305 casos de carcinoma mamário presentes no microarranjo de tecidos, 45 apresentavam história familiar positiva de câncer. Devido a artefatos da técnica, alguns casos foram excluídos da análise estatística.

Apenas 36 dos 45 tumores de mama de pacientes com história familiar positiva puderam ser avaliados para a expressão da proteína

ROBO1. Em 61,12% das amostras foi detectada marcação fraca ou ausente; 27,78% moderada e 11,10% forte. A Figura 27 ilustra o padrão de expressão do ROBO1 nas células tumorais mamárias.

Nessa análise também não foi observada nenhuma associação significativa entre os dados clínico-patológicos e ausência ou expressão fraca da proteína ROBO1 (Tabela 33). Embora não significativo, entre os 22 pacientes com marcação ausente ou fraca, 18 apresentavam tamanho tumoral 3-4, 18 apresentavam estadio III-IV, 16 envolvimento linfonodal e 14 grau tumoral 2-3.

Além disso, mais de 50% dos pacientes com dados clínico-patológicos de pior prognóstico apresentavam marcação ausente ou fraca. Entre os pacientes triplos negativos, 3/3 foram identificados com marcação ausente ou fraca. Os três casos apresentavam tamanho tumoral 3-4, estadio III-IV e envolvimento linfonodal.



**Figura 27** - Padrão de expressão citoplasmática da proteína ROBO1 em células de carcinomas mamários. **A.** Escore 0 (ausência de marcação). **B.** Escore 1 (marcação fraca). **C.** Escore 2 (marcação moderada). **D.** Escore 3 (marcação forte).

**Tabela 33** - Associação entre a expressão da proteína ROBO1, detectada por imunohistoquímica, e os dados clínicos de amostras tumorais de mama com história familiar de câncer.

Variáveis	n	N (%)			P
		0-1	2	3	
Idade (anos)					0,908
<45	9	6 (27,3%)	2 (20,0%)	1 (25,0%)	
≥45	27	16 (72,7%)	8 (80,0%)	3 (75,0%)	
T					0,364
T <sub>1-2</sub>	8	4 (18,2%)	2 (20,0%)	2 (50,0%)	
T <sub>3-4</sub>	28	18 (81,8%)	8 (80,0%)	2 (50,0%)	
Ln					0,189
Negativo	14	6 (27,3%)	6 (60,0%)	2 (50,0%)	
Positivo	22	16 (72,7%)	4 (40,0%)	2 (50,0%)	
M					-
Negativo	36	22 (100,0%)	10 (100,0%)	4 (100,0%)	
Positivo	0	-	-	-	
Estadiamento					0,364
I-II	8	4 (18,2%)	2 (20,0%)	2 (50,0%)	
III-IV	28	18 (81,8%)	8 (80,0%)	2 (50,0%)	
Grau Tumoral					0,060
G <sub>1</sub>	10	8 (36,4%)	-	2 (50,0%)	
G <sub>2-3</sub>	26	14 (63,4%)	10 (100,0%)	2 (50,0%)	
ER					0,620
Negativo	7	5 (25,0%)	2 (22,2%)	-	
Positivo	25	15 (75,0%)	7 (77,8%)	3 (100,0%)	
PR					0,836
Negativo	13	9 (47,4%)	3 (37,5%)	1 (33,3%)	
Positivo	17	10 (52,6%)	5 (62,5%)	2 (66,7%)	
HER2					0,839
Negativo	29	18 (90,0%)	8 (88,9%)	3 (100,0%)	
Positivo	3	2 (10,0%)	1 (11,1%)	-	

**Legenda.** N e n: número de pacientes; T: tamanho tumoral; Ln: envolvimento linfonodal; M: metástase; ER: receptor de estógeno; PR: receptor de progesterona; HER2: receptor do fator de crescimento epidermal humano 2.

### **TMA de carcinoma colorretal**

Entre os 288 casos de carcinoma colorretais presentes no microarranjo de tecidos, cinco preencheram aos critérios de Amsterdam (Anexo 2) e 44 os critérios de Bethesda (Anexo 3). Dessa maneira, os casos foram analisados em grupos. Devido a artefatos da técnica, alguns casos foram excluídos da análise estatística.

#### **Tumores com critério de Amsterdam**

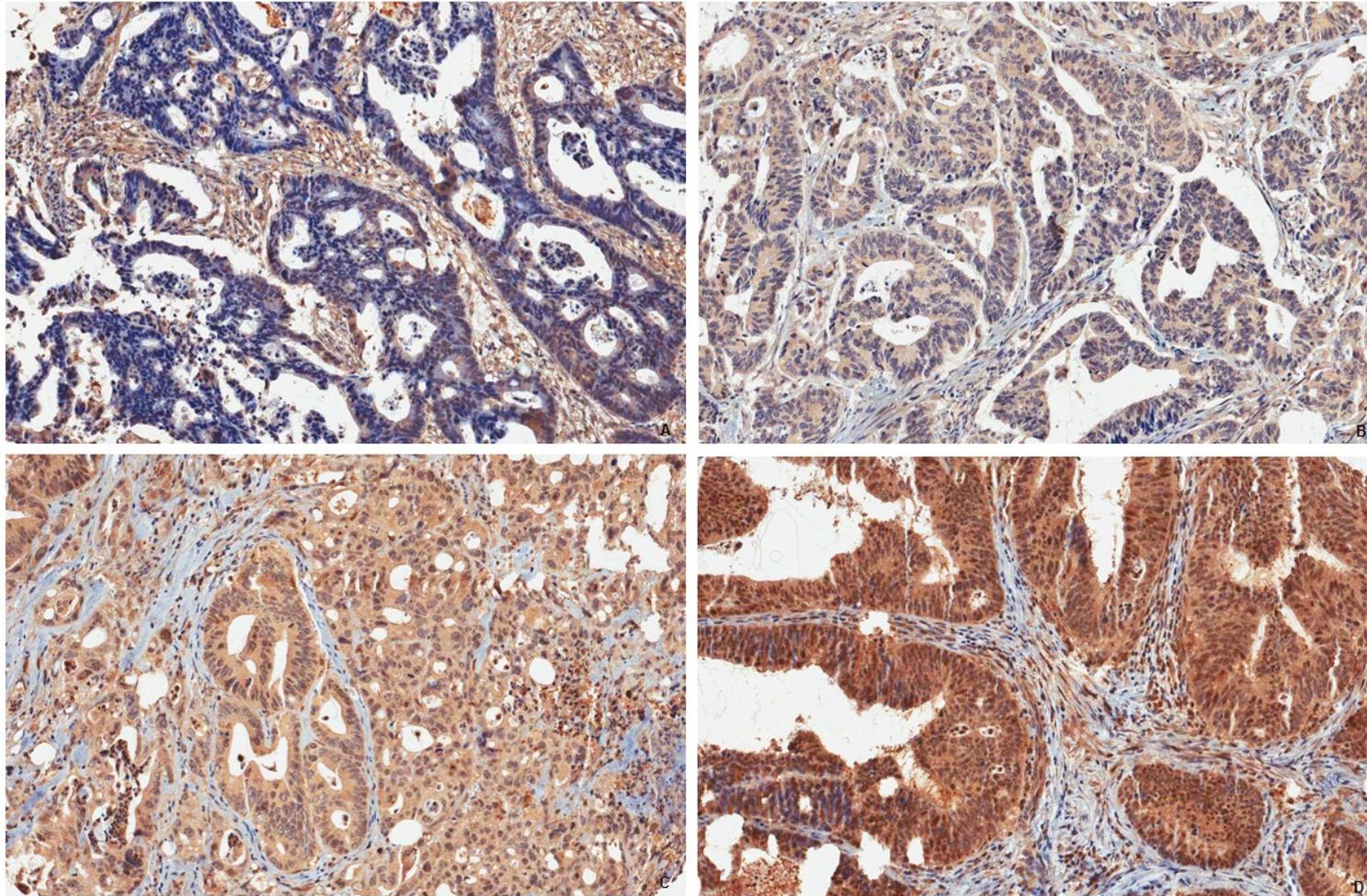
Este grupo compreende apenas cinco pacientes, todas com marcação citoplasmática. Dois casos são positivos para mutações no gene de reparo *MSH2* e apresentaram marcação fraca da proteína ROBO1. Além disso, ambas tinham ausência de envolvimento linfonodal e grau tumoral 1.

Duas pacientes negativas para a mutação apresentaram ausência de marcação para a proteína ROBO1 enquanto, a outra, apresentou marcação moderada. Não houve nenhuma associação dos dados clínicos-patológicos e a intensidade da marcação da proteína ROBO1 neste grupo.

#### **Tumores com critério de Bethesda**

Entre os 44 pacientes que preenchiam esse critério, 22 possuíam história familiar positiva de câncer, porém apenas 20 participaram da análise estatística. Em 65% dos casos foi observada marcação fraca ou ausente, 20,0% moderada e 15,0% forte. A Figura 28 ilustra o padrão de expressão do ROBO1 nas células tumorais de cólon.

Não houve associação significativa entre os dados clínico-patológicos e ausência ou expressão fraca da proteína ROBO1. Porém, embora não significativo, a marcação fraca ou ausente também foi identificada nos casos com pior prognóstico, como tamanho tumoral 3-4, envolvimento linfonodal, estadiamento III-IV e grau tumoral 2-3 (Tabela 34).



**Figura 28** - Padrão de expressão citoplasmática da proteína ROBO1 em células de carcinoma colorretal. **A.** Escore 0 (ausência de marcação). **B.** Escore 1 (marcação fraca). **C.** Escore 2 (marcação moderada). **D.** Escore 3 (marcação forte).

**Tabela 34** - Associação entre a expressão da proteína ROBO1, detectada por imunohistoquímica, e os dados clínicos de amostras tumorais de colorretal que preencheram aos critérios de Bethesda com história familiar positiva de câncer.

Variáveis	n	N (%)			P
		0-1	2	3	
Idade (anos)					0,540
<50	15	9 (69,2%)	3 (75,0%)	3 (100,0%)	
≥50	5	4 (30,8%)	1 (25,0%)	-	
T					0,417
T <sub>1-2</sub>	5	4 (33,3%)	-	1 (50,0%)	
T <sub>3-4</sub>	12	8 (66,7%)	3 (100,0%)	1 (50,0%)	
Ln					0,611
Negativo	7	4 (36,4%)	1 (33,3%)	2 (66,7%)	
Positivo	10	7 (63,6%)	2 (66,7%)	1 (33,3%)	
M					0,326
Negativo	14	9 (75,0%)	2 (50,0%)	3 (100,0%)	
Positivo	5	3 (25,0%)	2 (50,0%)	-	
Estadiamento					0,515
I-II	7	4 (36,4%)	1 (25,0%)	2 (66,7%)	
III-IV	11	7 (63,6%)	3 (75,0%)	1 (33,3%)	
Grau Tumoral					0,405
G <sub>1</sub>	5	4 (33,3%)	-	1 (33,3%)	
G <sub>2-3</sub>	14	8 (66,7%)	4 (100,0%)	2 (66,7%)	
Invasão					0,468
Perineural					
Negativa	10	6 (54,5%)	2 (100,0%)	2 (66,7%)	
Positiva	6	5 (45,5%)	-	1 (33,3%)	
Embolia					0,646
Linfática					
Negativa	13	9 (69,2%)	2 (100,0%)	2 (66,7%)	
Positiva	5	4 (30,8%)	-	1 (33,3%)	
Embolia					0,386
Vascular					
Negativa	16	12 (92,3%)	2 (100,0%)	2 (66,7%)	
Positiva	2	1 (7,7%)	-	1 (33,3%)	

**Legenda.** N e n: número de pacientes; T: tamanho tumoral; Ln: envolvimento linfonodal; M: metástase.

### **Análise da expressão da proteína ROBO1 nos casos que preenchem ao Critério da Síndrome de Mama-cólon (SMC)**

Para esta análise, foram utilizados tanto os casos com carcinoma mamário como os casos com carcinoma colorretal, ambos positivos para história familiar de câncer. Entre todos os pacientes presentes nos TMAs, apenas nove preenchem aos critérios da síndrome de mama-cólon. Apenas um paciente (SM9) faz parte da casuística deste estudo (grupo 2: câncer de mama e colorretal). O restante constitui pacientes independentes que desenvolveram apenas um tumor.

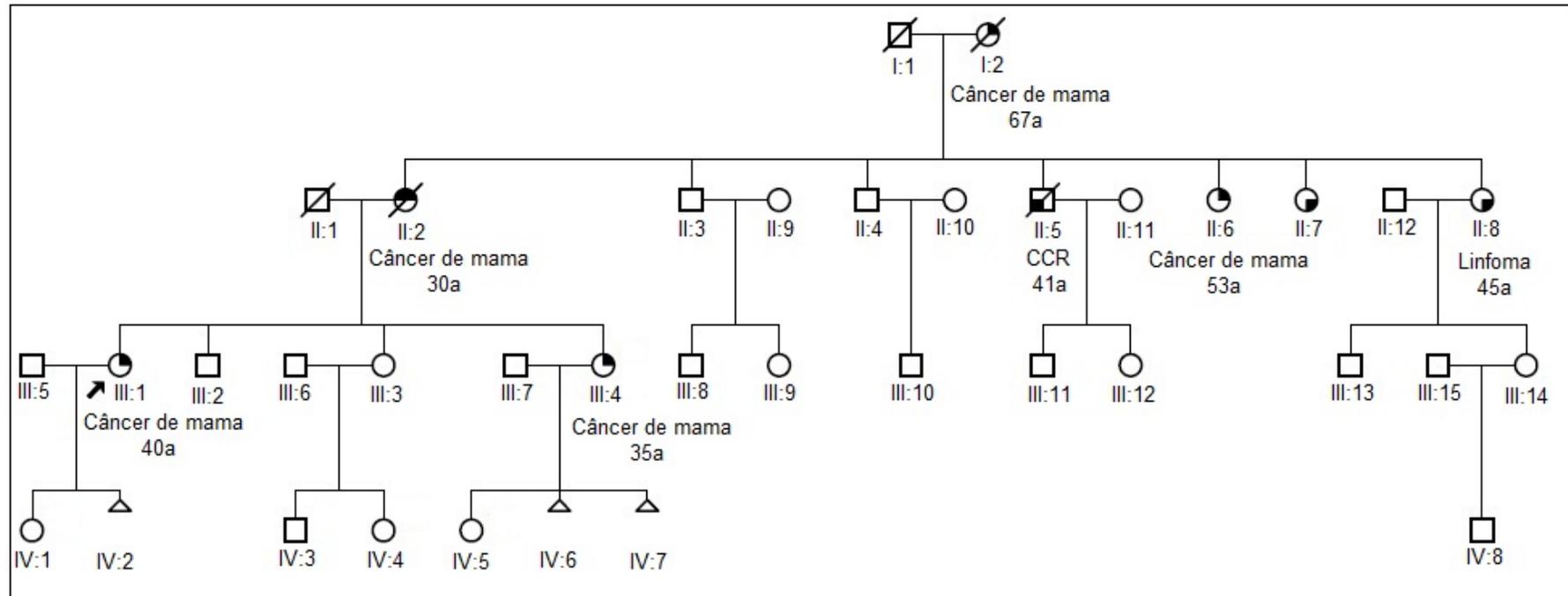
Entre as pacientes, 6/9 apresentaram marcação fraca ou ausente, 1/9 moderada e 2/9 forte. As pacientes com marcação moderada e forte desenvolveram câncer de mama, porém não houve associação entre os dados clínico-patológicos e a intensidade de marcação. Apesar da paciente SM9 ter apresentado marcação forte, o tecido apresentou tamanho tumoral 3-4, envolvimento linfonodal e estadio III-IV. A paciente com marcação moderada apresentou essas mesmas características.

Entre os casos com marcação fraca ou ausente, um desenvolveu câncer de mama enquanto os outros desenvolveram câncer colorretal. Também não houve associação entre os dados clínico-patológicos dos pacientes com a intensidade de marcação. Apenas um caso apresentou tamanho tumoral 3-4, envolvimento linfonodal, estadio III-IV e grau tumoral 2-3.

### 4.3.2 Família SM89

Após a confirmação de mutação no gene *BRCA1* (c.4406C>A, p.tyr1429X) na paciente SM89, seus familiares (SM89.2 – III:3, SM89.3 – II:8, SM89.4 – III:4, SM89.5 – IV:5, SM89.6 – III:14 e SM89.7 – II:7) foram convocados para anamnese, análise cromossômica, avaliação da mutação específica no gene *BRCA1* e triagem de CNVs.

A paciente SM89 foi diagnosticada com câncer de mama aos 40 anos. A probanda, além de preencher os critérios da Síndrome de Mama-cólon (SMC2), descrito no item 3.1 do material e métodos, também preenche os critérios da Síndrome de Mama-ovário (SMO). Entre as seis parentes que aceitaram participar do estudo, apenas duas apresentaram história pessoal de câncer: a irmã, SM89.4 (III:4), desenvolveu câncer de mama aos 35 anos e, a tia, SM89.3 (II:8), apresentou linfoma aos 45 anos (Figura 29).



**Figura 29** - Heredograma do caso SM89. A probanda do estudo (III:1, seta) foi diagnosticada com câncer de mama aos 40 anos; a irmã (III:4), SM89.4, apresentou câncer de mama aos 35 anos; a tia (II:8), SM89.3, apresentou linfoma aos 45 anos. Os parentes SM89.2 (III:3), SM89.5 (IV:5), SM89.6 (III:14) e SM89.7 (II:7) não possuem histórico pessoal de câncer. A tia (II:6) é positiva para mutação no gene *BRCA1*.

No exame clínico, a probanda e as familiares SM89.4 (III:4) e SM89.5 (IV:5) apresentaram o mesmo fenótipo (Tabela 35) e foi observado um histórico reprodutivo semelhante nas SM89 e SM89-4 (GIIPIAEI e GIIPIAEII, respectivamente).

**Tabela 35** - Características fenotípicas observadas na paciente SM89 e em dois familiares.

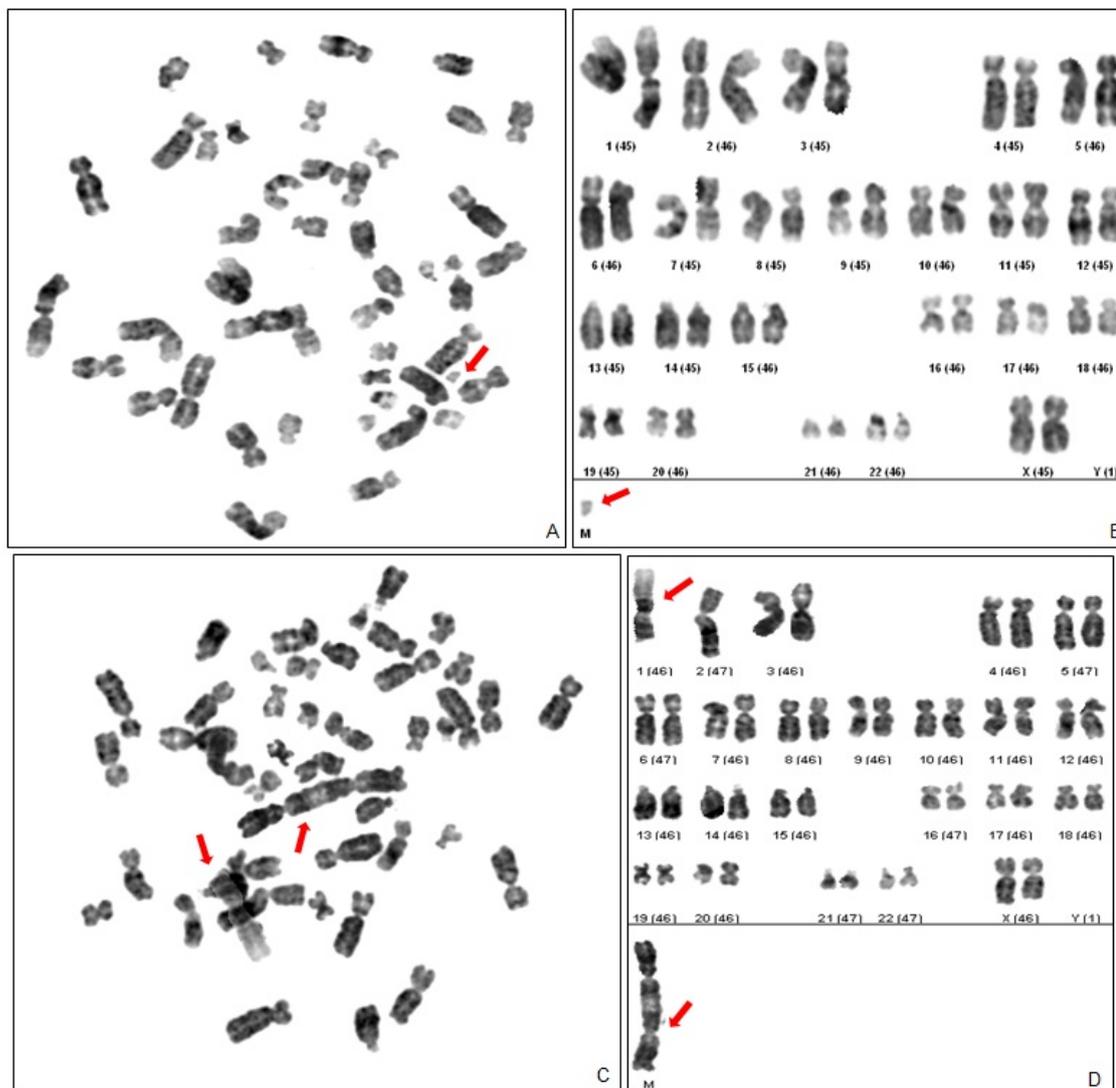
Características Fenotípicas	Pacientes		
	SM89	SM89.4	SM89.5
Hábito longilíneo	+	+	+
Fenda palpebral discretamente oblíqua descendente	+	+	+
Nariz longo com ponta proeminente	+	+	+
Hipoplasia das asas nasais	+	+	+
Palato alto	+	+	+
Prognatia discreta	+	+	+
Pescoço alado e curto	+	+	+
Implantação baixa de cabelos em nuca	+	+	+
Mãos com dedos alongados e clinodactilia do 3º e 4º dedos	+	+	+
Pés com dedos alongados e clinodactilia do 4º dedos	+	+	+

**Legenda.** + presença

Após a identificação das características fenotípicas, foi realizada a análise cromossômica de todas as pacientes, exceto da SM89.3. Entre os indivíduos avaliados, foram identificadas uma variedade de alterações estruturais, como ganho ou perda cromossômica, associações teloméricas (tas), cromossomos dicêntricos (dic) e a presença de cromossomos marcadores (M).

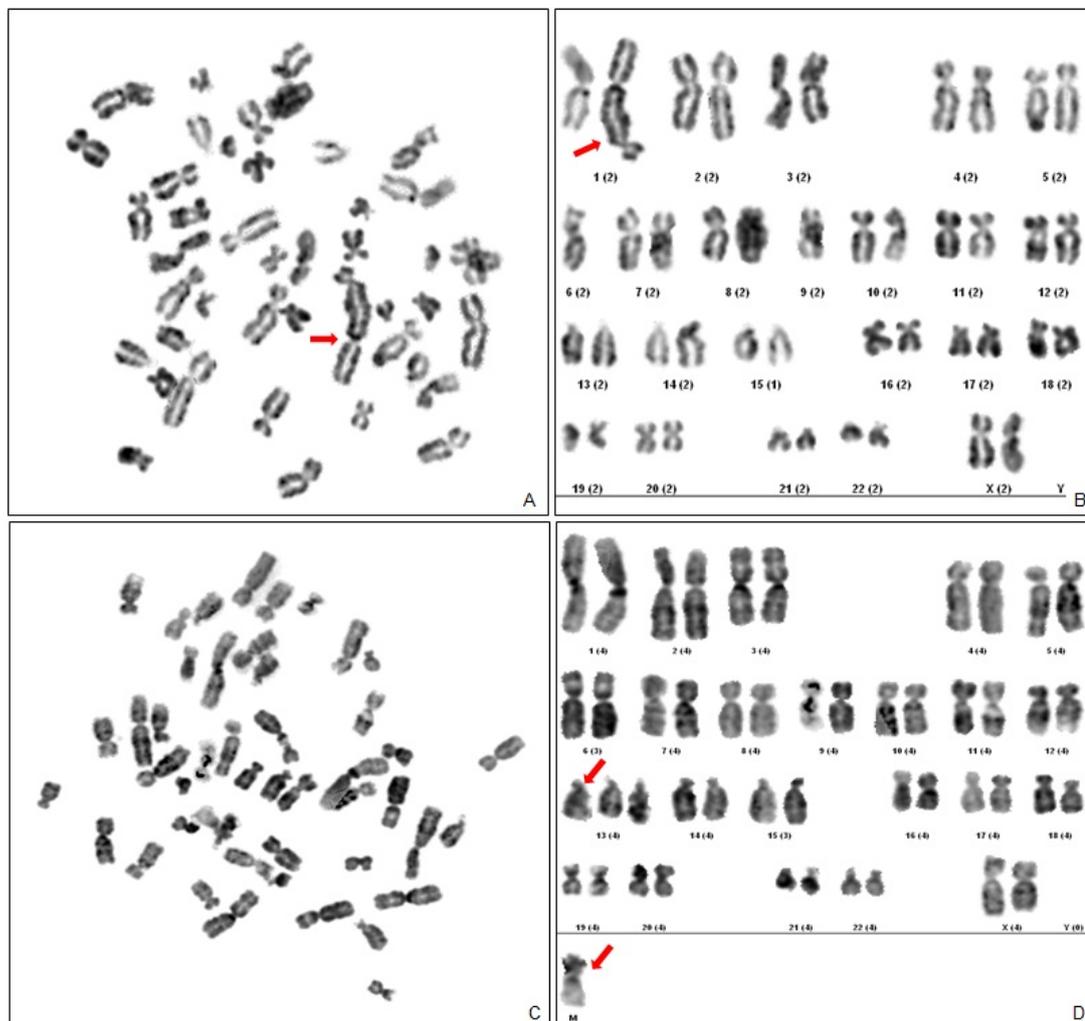
O caso SM89, positiva para mutação em *BRCA1*, com diagnóstico de câncer e com fenótipo peculiar, apresentou uma possível deleção no braço curto do cromossomo 19, pequenos cromossomos marcadores

(Figura 30A-B), deleção do cromossomo 1, translocação entre os cromossomos 1 e 7, cromossomos dicêntricos e fusões teloméricas (Figura 30C-D).



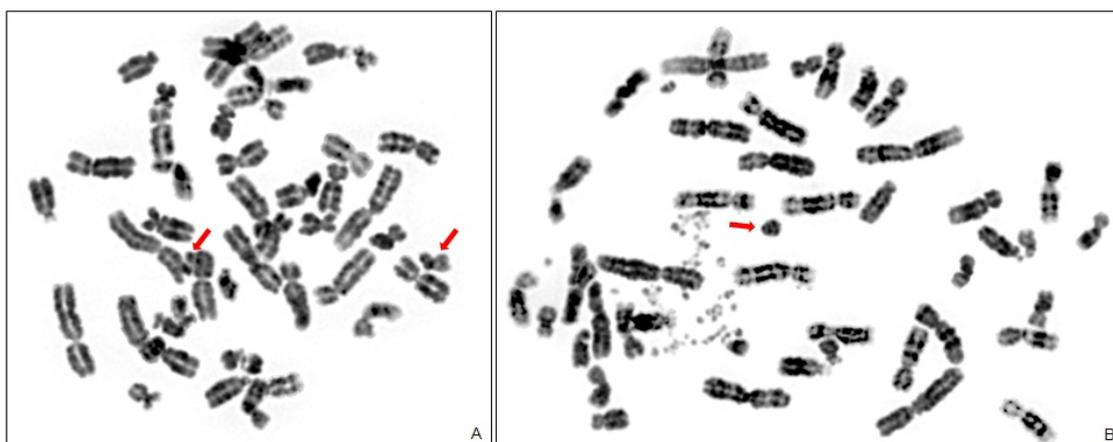
**Figura 30** - Análise citogenética do caso SM89. **A-B.** Cariótipo 47,XX,19p-(?),17p-(?),+M. **C-D.** Cariótipo 45,XX,Xq+,del(1)(q42.1),-2,+dic(1;2) (1pter>q36.3::2p4).

A SM89.2 (III:3), negativa para mutação em *BRCA1* e sem diagnóstico de câncer, apresentou fusões teloméricas (Figura 31A-B) e cromossomos marcadores (Figura 31C-D).



**Figura 31** - Análise citogenética do caso SM89.2. **A-B.** Cariótipo 4,XX,+fusão1. **C-D.** Cariótipo 48,XX,+13,+M.

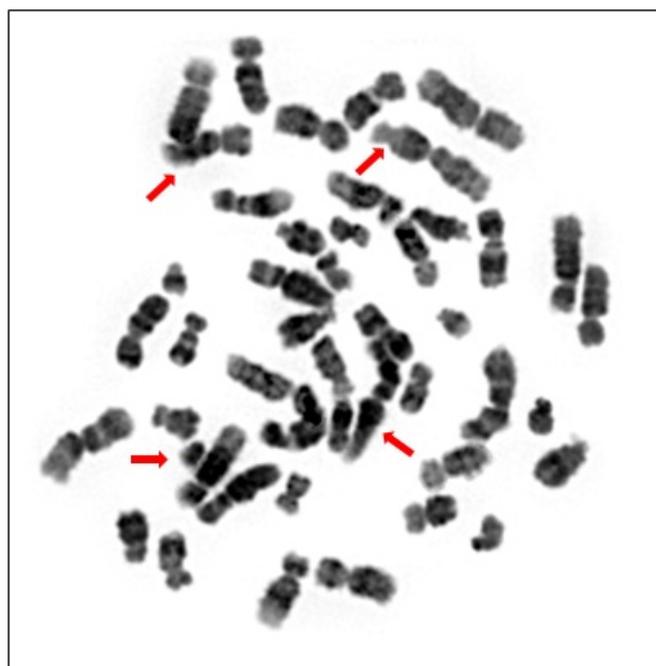
A SM89.4 (III:4), positiva para mutação em *BRCA1*, com diagnóstico de câncer e com fenótipo peculiar, apresentou possível deleção no braço curto do cromossomo 19, pequenos cromossomos marcadores e perda do cromossomo 20 (Figura 32A) e presença de múltiplos fragmentos cromossômicos (Figura 32B).



**Figura 32** - Análise citogenética do caso SM89.4. **A.** Cariótipo 45,XX,:1p,-20,+M.

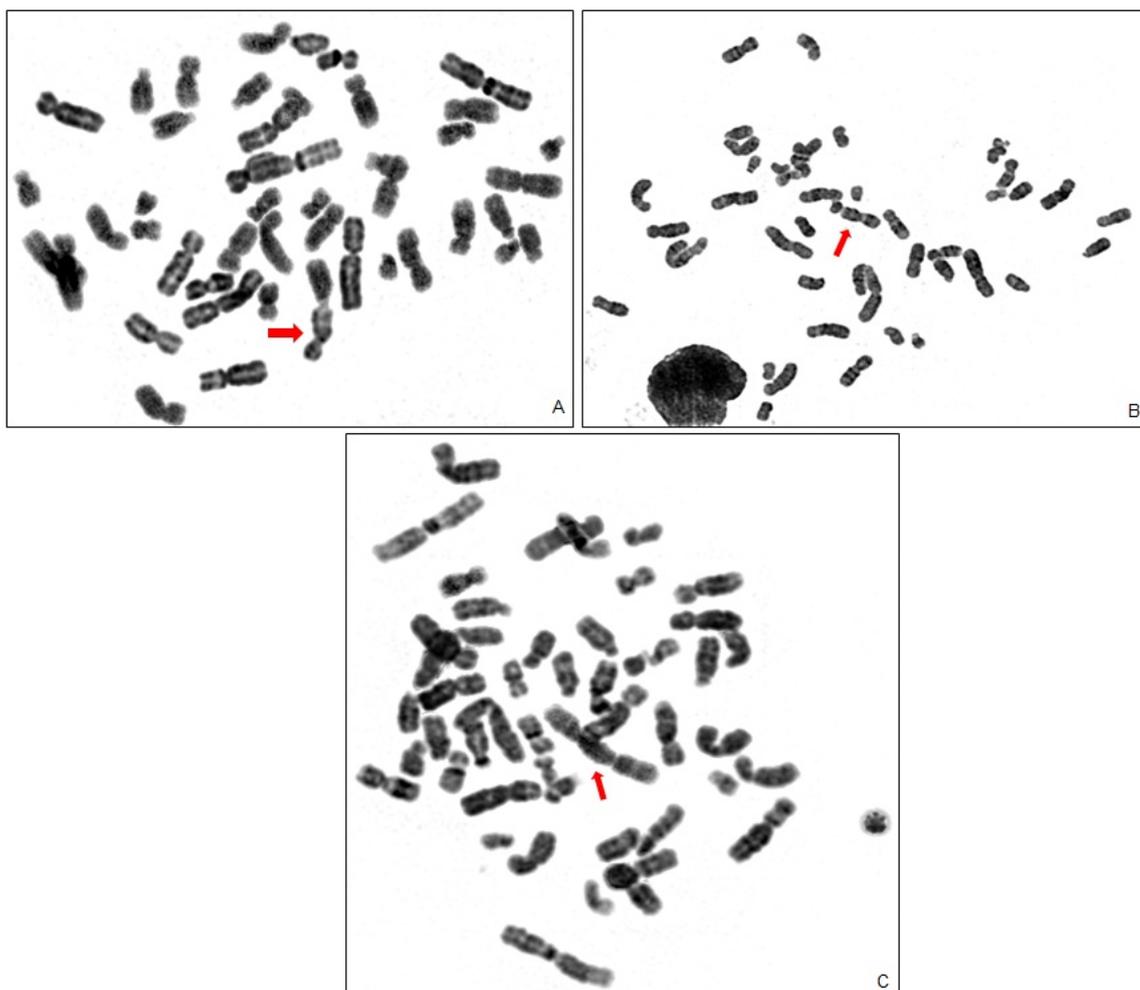
**B.** Múltiplos fragmentos cromossômicos.

A SM89.5 (IV:5), positiva para mutação em *BRCA1*, sem diagnóstico de câncer e com fenótipo peculiar, apresentou possível deleção no braço curto do cromossomo 19, translocação entre os cromossomos 6 e 14, perdas e ganhos cromossômicos e pequenos cromossomos marcadores (Figura 33).



**Figura 33** - Análise citogenética do caso SM89.5. Cariótipo 45,XX,-1,7q+,-9,-15,-16,+17,+17,-20,+M1,+M2.

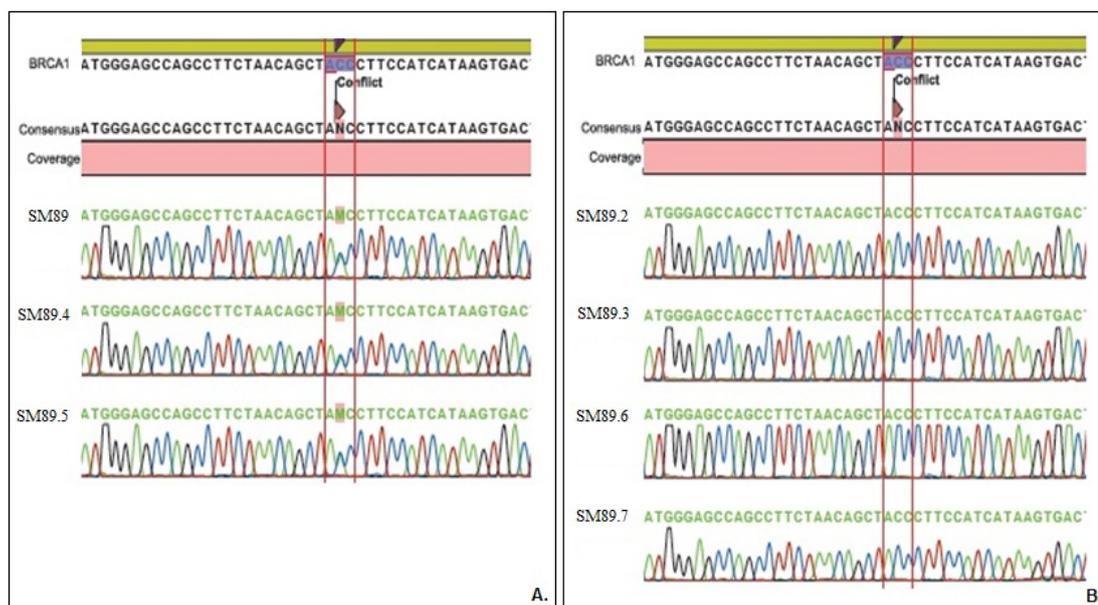
A SM89.6 (III:14) e SM89.7 (II:7), ambas negativas para mutação em *BRCA1* e sem diagnóstico de câncer, apresentaram apenas fusão telomérica, envolvendo diferentes cromossomos (SM89.6: cromossomos 9 e 15; SM89.7: cromossomos 11 e 16) (Figura 34A-B). A SM89.7 também apresentou ganhos e perdas cromossômicas (Figura 34C).



**Figura 34** - Análise citogenética do caso SM89.6 e SM89.7. **A.** SM89.6: fusão telomérica entre os cromossomos 9 e 15. **B.** SM89.7: fusão telomérica entre os cromossomos 11 e 16. **C.** SM89.7: fusão telomérica, +14,+14,+14,+16,+16,+16.

A presença de pequenos cromossomos marcadores foram identificados apenas nos casos com fenótipo peculiar SM89, SM89.4 e SM89.5.

A análise de sequenciamento do gene *BRCA1*, demonstrou que os familiares SM89.4 (III:4) e SM89.5 (IV:5) apresentavam a mesma mutação do probando (c.4406C>A, p.tyr1429X), ou seja, a troca de uma citosina por adenina, gerando um stop códon no domínio de ligação do DNA da proteína *BRCA1* (Figura 35). Esta mutação gera uma proteína truncada, sem o domínio BRCT, resultando na perda da regulação do ciclo celular e reparo a danos do DNA.



**Figura 35** - Representação gráfica do sequenciamento do gene *BRCA1* na paciente SM89 e seus familiares. **A.** Mutação *nonsense* resultado da substituição da citosina por adenina, foi identificada na paciente SM89 e nos familiares SM89.4 e SM89.5. **B.** Os familiares SM89.2, SM89.3, SM89.6 e SM89.7 não apresentaram a mutação.

A Tabela 36 representa um resumo da presença e ausência de mutação, história pessoal de câncer e parentesco dos familiares com a paciente SM89.

**Tabela 36** - Resumo das características da família SM89.

Casos	Características				
	Heredograma	Parentesco	Mutação	Câncer	Fenótipo*
<b>SM89</b>	III:1	Probanda	+	Mama	+
<b>SM89.2</b>	III:3	Irmã	-	-	ig
<b>SM89.3</b>	II:8	Tia (M)	-	Linfoma	ig
<b>SM89.4</b>	III:4	Irmã	+	Mama	+
		Sobrinha			
<b>SM89.5</b>	IV:5	(Filha SM89.4)	+	-	+
		Prima			
<b>SM89.6</b>	III:14	(Filha SM89.3)	-	-	ig
<b>SM89.7</b>	II:7	Tia (M)	-	-	ig

**Legenda.** \* características físicas descritas na tabela 34; - negativo/ausência; + positivo/presença; ig não foi analisado; M: origem materna.

A metodologia de aCGH foi aplicada em amostras de DNA do sangue periférico e do tecido tumoral mamário da probanda SM89. No primeiro, identificou-se um total de 5 CNVs, sendo dois ganhos e três perdas genômicas. As CNVs envolvidas em ganhos foram classificadas como rara e nova rara e, as envolvidas em perda, eram comuns. No tecido tumoral, identificou-se um total de 165 CNVs, sendo 92 ganhos e 73 perdas genômicas. As alterações detectadas no DNA do sangue periférico também foram observadas no DNA tumoral.

A análise do DNA tumoral dos familiares da paciente SM89, revelou uma variação entre 3-20 CNVs (média de 7,33/indivíduo; desvio padrão: 6,74 CNVs/indivíduo). Os pacientes com a mutação no gene

*BRCA1* apresentaram 12 CNVs (SM89: 5 CNVs; SM89.4: 3 CNVs; SM89.5: 4CNVs). Já os pacientes, negativos para a mutação, apresentaram 36 CNVs (SM89.2: 2 CNVs; SM89.3: 4 CNVs; SM89.6: 10 CNVs; SM89.7: 20 CNVs).

Após a comparação com banco de dados da amostra de referência e com o DGV, foram identificadas no grupo de pacientes positivos para mutação no gene *BRCA1*, quatro CNVs envolvidas em ganhos genômicos, sendo duas raras e duas novas raras, mapeadas na mesma região cromossômica (Xp22.2), porém de tamanhos diferentes (CNV rara: 204.206 pb e 222.400 pb; CNV nova rara: 117.300 pb e 130.095 pb). A sobrinha da probanda, SM89.5, apresentou apenas uma CNV rara envolvida em perda genômica englobando a região cromossômica 5q13.2 (tamanho: 1.520.706 pb) (Tabela 36).

Entre os pacientes negativos para mutação no gene *BRCA1*, foram identificadas 17 CNVs raras (dois ganhos e 18 perdas genômicas) e seis CNVs novas raras (um ganho e cinco perdas genômicas). A irmã da probanda, SM89.2, apresentou apenas duas CNVs raras, envolvidas em perda genômica (Tabela 37).

Apenas as CNVs comuns foram idênticas em mais de um indivíduo da família SM89. As CNVs raras e novas raras não foram idênticas, porém envolveram a mesma região cromossômica. As CNVs raras 9q34.2 e 22q11.21, envolvidas em perdas genômicas, foram identificadas nos indivíduos SM89.6 (tia) e SM89.7 (sobrinha) que não desenvolveram câncer e não apresentaram a mutação no gene *BRCA1*. O gene *RXRA*,

mapeado em 9q34.2, está envolvido com metabolismo e comunicação celular e foi descrito nos processos tumorais de mama e colorretal. A alteração identificada na região 22q11.21 possui mais de um gene, porém apenas um foi idêntico nas duas pacientes, *RTN4R*. Esse gene está envolvido na estrutura, motilidade, transporte, crescimento, desenvolvimento, manutenção e comunicação celular, porém não foi descrito em processos tumorais. A CNV mapeada em Xp22.2 foi identificada em cinco indivíduos, porém duas foram semelhantes nas SM89 e SM89.4 e três nas SM89, SM89.2 e SM89.4. As pacientes SM89 e SM89.4 desenvolveram câncer de mama em idade jovem, apresentam a mutação em *BRCA1* e possuem o mesmo fenótipo. A alteração envolvendo essas pacientes engloba os genes *HCCS* e *ARHGAP6*. Ambos estão envolvidos na estrutura, motilidade, transporte, metabolismo, crescimento, desenvolvimento e manutenção celular. Porém apenas o gene *ARHGAP6* também está envolvido na comunicação celular.

**Tabela 37** - Alterações identificadas na paciente SM89 e em seus familiares, geradas pelo software *DNA Analytics*.

Casos	Região Cromossômica	Start	End	Tamanho (pb)	Grupo Controle	Tipo CNV	Nº Sondas	Evento	P valor	Genes	MicroRNAs	Nº CNVs
SM89.4 <sup>1*</sup>		72541243	72568209	26966	>1%	Comum	3	P	2,51E-17	-*	-	++
SM89.5 <sup>1</sup>	1p31.1	72541243	72568209	26966	>1%	Comum	3	P	2,97E-22	-*	-	++
SM89.6		72541243	72568209	26966	>1%	Comum	3	G	5,16E-13	-*	-	++
SM89.7		72541243	72568209	26966	>1%	Comum	3	P	4,09E-19	-*	-	++
SM89.2	1p31.1	72541243	72652273	111030	1%	Rara	5	P	7,28E-13	-*	-	++
SM89.3*	1p34.3	34919088	35000653	81565	0	Nova rara	6	G	1,47E-10	<i>GJB5, GJB4</i>	-	-
SM89.7	1p36.33	842526	870300	27774	0	Rara	3	P	2,15E-11	<i>FLJ39609, SAMD11, NOC2L</i>	-	+
SM89.7	1p36.33	842526	1436882	594356	0	Rara	37	P	3,57E-35	<i>FLJ39609, SAMD11, NOC2L, KLHL17, PLEKHN1, HES4, HES4, ISG15, AGRN, C1orf159, TTLL10, TNFRSF18, TNFRSF4, SDF4, B3GALT6, FAM132A, UBE2J2, LOC100128842, SCNN1D, ACAP3, PUSL1, CPSF3L, GLTPD1, TAS1R3, DVL1, MXRA8, AURKAIP1, CCNL2, LOC148413, MRPL20, LOC441869, TMEM88B, VWA1, ATAD3C, ATAD3B</i>	hsa-mir-200b, hsa-mir-200a, hsa-mir-429	++
SM89.7	1q44	2,47E+08	2,47E+08	88004	0	Rara	8	G	6,86E-10	<i>OR2T34, OR2T10, OR2T11, OR2T35, OR2T27</i>	-	++
SM89.6	2p22.3	34556234	34580733	24499	>1%	Comum	3	P	3,34E-42	-*	-	++
SM89 <sup>1*</sup>		1,64E+08	1,64E+08	104948	>1%	Comum	6	P	6,64E-72	-*	-	++
SM89.5 <sup>1</sup>	3q26.1	1,64E+08	1,64E+08	104948	>1%	Comum	6	P	2,34E-137	-*	-	++
SM89.6		1,64E+08	1,64E+08	104948	>1%	Comum	6	P	5,73E-122	-*	-	++

**Cont/ Tabela 37**

Casos	Região Cromossômica	Start	End	Tamanho (pb)	Grupo Controle	Tipo CNV	Nº Sondas	Evento	P valor	Genes	MicroRNAs	Nº CNVs
<b>SM89.7</b>	4p16.3	663477	1613342	949865	0	Rara	70	P	4,37E-32	MYL5, MFSD7, PCGF3, CPLX1, GAK, TMEM175, DGKQ, SLC26A1, IDUA, FGFRL1, RNF212, SPON2, LOC100130872, CTBP1, C4orf42, MAEA, KIAA1530, CRIPAK, FAM53A	-	++
<b>SM89<sup>1*</sup></b>	4q13.2	69074940	69145174	70234	>1%	Comum	6	P	6,73E-42	UGT2B17	-	++
<b>SM89.3*</b>		69074940	69145174	70234	>1%	Comum	6	P	8,87E-40	UGT2B17	-	++
<b>SM89.5<sup>1</sup></b>	5q13.2	68885150	70405856	1520706	1%	Rara	3	P	1,53E-17	OCLN, LOC647859, GTF2H2C, GTF2H2, GTF2H2B, GTF2H2D, LOC100272216, LOC653188, SERF1A, SERF1A, SERF1B, SMN2, SMN1, LOC100170939, SERF1A, SERF1A, SERF1B, NAIP, OCLN, LOC647859	-	++
<b>SM89.6</b>	6p21.33	31395130	31434141	39011	0	Rara	3	P	1,68E-23	HLA-B	-	++
<b>SM89<sup>1*</sup></b>	6q14.1	79035691	79080188	44497	>1%	Comum	3	P	3,40E-47	-*	-	++
<b>SM89.7</b>	7p15.2	27152097	27165304	13207	0	Nova rara	3	P	1,79E-14	HOXA6, HOXA7	-	-
<b>SM89.7</b>	7p22.3	1020523	1030877	10354	0	Nova rara	3	P	2,06E-09	C7orf50	hsa-mir-339	-
<b>SM89.7</b>	7p22.3 - p22.2	983424	2127052	1143628	0	Rara	88	P	1,86E-55	CYP2W1, C7orf50, GPR146, GPER, ZFAND2A, UNCX, MICALL2, INTS1, MAFK, TMEM184A, PSMG3, PSMG3, KIAA1908, TFAMP1, ELFN1, MAD1L1	hsa-mir-339	++
<b>SM89.7</b>	7q36.1	1,5E+08	1,5E+08	17053	0	Rara	3	P	1,39E-14	CDK5, SLC4A2	-	+

**Cont/ Tabela 37**

Casos	Região Cromossômica	Start	End	Tamanho (pb)	Grupo Controle	Tipo CNV	Nº Sondas	Evento	P valor	Genes	MicroRNAs	Nº CNVs
SM89.7	7q36.1	1,51E+08	1,51E+08	42788	0	Rara	5	P	1,18E-09	PRKAG2	-	+
SM89.7	9q22.31	94915121	94958628	43507	0	Nova rara	4	P	8,82E-11	C9orf89, NINJ1	-	-
SM89.7	9q34.11	1,31E+08	1,31E+08	55934	0	Rara	6	P	2,91E-24	SH3GLB2, FAM73B	-	+
SM89.7	9q34.2	1,36E+08	1,36E+08	26893	0	Rara	3	P	7,67E-65	RXRA	-	+
SM89.6	9q34.2	1,36E+08	1,36E+08	35286	0	Rara	4	P	1,32E-09	RXRA	-	+
SM89.7	10q26.3	1,34E+08	1,34E+08	31413	0	Rara	3	P	2,95E-19	INPP5A	-	+
SM89.5 <sup>1</sup>		55134286	55207505	73219	>1%	Comum	8	P	2,35E-122	OR4P4, OR4S2, OR4C6	-	++
SM89.6	11q11	55134286	55207505	73219	>1%	Comum	8	G	5,56E-14	OR4P4, OR4S2, OR4C6	-	++
SM89.7		55134286	55207505	73219	>1%	Comum	8	G	1,99E-12	OR4P4, OR4S2, OR4C6	-	++
SM89.3*	12p13.31	9528390	9554349	25959	0	Rara	3	P	1,72E-13	-*	-	++
SM89.7	12p13.31	9528390	9604833	76443	>1%	Comum	7	G	7,00E-13	-*	-	++
SM89.7	12q24.33	1,31E+08	1,32E+08	347999	0	Rara	24	P	2,39E-12	DDX51, NOC4L, GALNT9, GALNT9, LOC100130238	-	++
SM89.3*	14q24.3	73071204	73092218	21014	>1%	Comum	3	P	9,50E-10	HEATR4, ACOT1	-	++
SM89.6	15q11.2	18862856	19833742	970886	0	Rara	23	G	7,88E-36	LOC727832, GOLGA8C, LOC646214, CXADRP2, POTE8, LOC727924	-	++
SM89.6	17q21.31	41527505	41700962	173457	>1%	Comum	12	G	1,26E-17	KIAA1267	-	++
SM89.7	17q25.3	76533841	77072840	538999	0	Rara	47	P	3,04E-25	KIAA1303, CHMP6, FLJ90757, BAIAP2, AATK, LOC388428, AZI1, C17orf56, C17orf89, SLC38A10, C17orf55, TMEM105, BAHCC1	hsa-mir-657, hsa-mir-338, hsa-mir-1250	++

**Cont/ Tabela 37**

Casos	Região Cromossômica	Start	End	Tamanho (pb)	Grupo Controle	Tipo CNV	Nº Sondas	Evento	P valor	Genes	MicroRNAs	Nº CNVs
<b>SM89.7</b>	19p13.13	12647311	12675266	27955	0	Nova rara	3	P	2,51E-11	<i>MORG1, DHPS, FBXW9, TNPO2</i>	-	-
<b>SM89.6</b>	22q11.21	18523876	18650642	126766	0	Rara	16	P	2,17E-12	<i>LOC150197, RTN4R</i>	-	++
<b>SM89.7</b>	22q11.21	18481712	18650642	168930	0	Rara	20	P	1,73E-22	<i>TRMT2A, RANBP1, ZDHHC8, LOC150197, RTN4R</i>	hsa-mir-1286	++
<b>SM89.6</b>	22q12.2	28662058	28690655	28597	0	Nova rara	4	P	4,89E-12	<i>MTMR3</i>	-	-
<b>SM89<sup>1*</sup></b>	Xp22.2	11023614	11140914	117300	0	Nova rara	10	G	3,208E-34	<i>HCCS, ARHGAP6</i>	-	-
<b>SM89.4<sup>1*</sup></b>	Xp22.2	11023614	11153709	130095	0	Nova rara	11	G	1,13E-46	<i>HCCS, ARHGAP6</i>	-	-
<b>SM89<sup>1*</sup></b>	Xp22.2	15489239	15693445	204206	0	Rara	19	G	1,76E-49	<i>ACE2, TMEM27, CA5BP, CA5B</i>	-	+
<b>SM89.4<sup>1*</sup></b>	Xp22.2	15489239	15711639	222400	0	Rara	20	G	1,55E-75	<i>ACE2, TMEM27, CA5BP, CA5B</i>	-	+
<b>SM89.2</b>	Xp22.2	15462061	15711639	249578	0	Rara	23	P	8,48E-29	<i>BMX, ACE2, TMEM27, CA5BP, CA5B</i>	-	+

**Legenda.** P: perda genômica; G: ganho genômico; <sup>1</sup>: positivo para mutação no gene BRCA1; \*: positivo para história familiar de câncer; - ausência; +: ≤ 3 CNVs descritas no banco de dados DGV; ++: > 3 CNVs no DGV; \* regiões cromossômicas analisadas no Hg19: .apenas a alteração em 3q26.1 apresentou gene mapeado (*BC073807*), porém ele não codifica proteína.

## 5 DISCUSSÃO

As variações genéticas herdadas, como número de cópias, SNPs e mutações germinativas em genes específicos, têm sido associadas com o aumento do risco de desenvolvimento do câncer. No final dos anos 80, foram identificados alguns genes de suscetibilidade ao câncer, como *BRCA1* e *BRCA2* (câncer de mama e ovário), *MLH1* e *MSH2* (câncer colorretal) e *CDKN2A* (melanoma), que conferem um risco aumentado para o desenvolvimento do tumor entre os portadores (FLETCHER e HOULSTON 2010). Existem aproximadamente 100 genes de alta penetrância responsáveis por algumas síndromes hereditárias de câncer. Estas, além de apresentarem fortes evidências de história familiar, geralmente afetam múltiplas gerações e obedecem um padrão de herança Mendeliana. A maioria desses tumores resulta da segregação de mutações ou deleção de genes supressores tumorais. Essas variações genéticas herdadas podem promover a perda de função de genes supressores tumorais, que resultam no aumento do risco de desenvolvimento de câncer entre os portadores de mutações nesses genes de predisposição (KUIPER et al. 2010). Exemplos destes genes incluem os supressores de tumor *BRCA1* e *BRCA2*, envolvidos na Síndrome do Câncer de Mama-Ovário; *MLH1* e *MSH2* na Síndrome de Lynch e *CDKN2A* em melanomas familiares. De acordo com a hipótese de KNUDSON (1971), é necessário dois eventos para promover o desenvolvimento do tumor. No caso das doenças hereditárias, o primeiro

evento representa a transmissão de uma alteração germinativa para a próxima geração, enquanto o segundo evento, ocorre no decorrer da vida.

Mesmo sabendo que as síndromes de cânceres hereditários são relativamente raras, representando 5 a 10% de todos os casos da doença (NAGY et al. 2004), portadores de mutações possuem um risco aumentado de desenvolver um tumor. Um exemplo são pacientes com mutação nos genes *BRCA1* e *BRCA2*. Portadores de mutação germinativa em *BRCA1* têm um risco cumulativo aumentado de desenvolver câncer de mama e ovário. Outros tumores associados a mutações em *BRCA1* são o câncer de trompa de falópio, câncer de próstata e tumor de Wilms (THOMPSON e EASTON 2002; HODGSON et al. 2007). Em relação ao gene *BRCA2*, observa-se um maior risco para câncer de mama em homens, câncer de próstata, pâncreas, estômago, vias biliares e melanoma, além do câncer de mama e ovário (ROBSON et al. 1998; Anonymous 1999; THOMPSON e EASTON 2002; SHULMAN 2010).

Neste estudo, foi realizada a avaliação de alterações genômicas por CGH *array* para identificar genes candidatos associados à Síndrome do Câncer de Mama-Cólon em probandos e seus familiares. Para isso, em um estudo prévio, foram avaliadas mutações em genes que já foram descritos como tendo alta penetrância associados a estes tumores particulares. Entre eles, o *BRCA1* e *BRCA2* associado a Síndrome do câncer de mama e ovário, o gene *TP53* associado a Síndrome de Li-Fraumeni, os genes de reparo a danos no DNA (*MLH1* e *MSH2*) associados a Síndrome de Lynch e o gene *CHEK2* já relatado em pacientes com síndromes hereditárias de

câncer de mama e cólon. Grande parte da investigação destas mutações fizeram parte de outro estudo coordenado pelo Dr Benedito Mauro Rossi e Dra Dirce M Carraro (DOMINGUEZ et al. 2008; VALENTIN et al. 2011; SANTOS et al. 2012).

As CNVs identificadas neste estudo foram classificadas em comuns, raras e novas raras após comparação com o grupo referência. Estas CNVs podem ocorrer em genes supressores tumorais ou oncogenes envolvidos em processos tumorais. Em 2010, SHLIEN e MALKIN relataram que apesar das CNVs comuns serem frequentemente identificadas na população saudável, elas podem desempenhar um importante papel nos estágios iniciais da carcinogênese. Segundo os autores, essas CNVs podem conferir um risco moderado para o desenvolvimento da doença. Nesse mesmo ano, KUIPER et al. (2010) relataram que as CNVs raras podem alterar genes envolvidos em processos tumorais, resultando no aumento do risco de desenvolvimento tumoral. Em seu estudo, SHLIEN e MALKIN (2010) relataram que, muitas vezes, as alterações raras podem segregar juntamente com a doença entre os familiares.

As alterações raras e novas raras englobando genes candidatos ao desenvolvimento e predisposição tumoral, envolvidos em ganhos ou perdas genômicas, foram comuns (observadas em pacientes do grupo 1 e 2) ou exclusivas de cada grupo. Porém, apenas as CNVs novas raras, ausentes no grupo controle e no banco de dados do DGV, serão apresentadas abaixo. As CNVs novas raras identificadas nos pacientes sem mutação serão discutidos no item 5.1.1 e as alterações genômicas identificadas nos

pacientes positivos para mutação nos genes de predisposição serão discutidos no item 5.1.2.

## **5.1 CGH ARRAY**

### **5.1.1 Casos sem mutação nos genes *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *CHEK2*, *MLH1*, *MSH2***

Neste estudo observou-se uma diferença não significativa no número total de cópias genômicas entre os grupos 1 e 2. O grupo 1 (pacientes com câncer de mama ou colorretal) apresentou uma média de CNVs semelhante ao grupo controle, porém o grupo 2 (pacientes com câncer de mama e colorretal) apresentou um aumento de CNVs quando comparado com o grupo controle e o grupo 1.

A semelhança no número de CNVs entre o grupo 1 e o grupo controle também foi observada em dois estudos, YOSHIHARA et al. (2011) e KREPISCHI et al. (2012a). No estudo de YOSHIHARA et al. (2011), os autores compararam o número de CNVs identificadas em três grupos distintos: (1) pacientes positivas para mutação no gene *BRCA1* e com diagnóstico de câncer de ovário; (2) pacientes sem a mutação, mas com a doença (grupo esporádico); (3) pacientes saudáveis (grupo controle). Eles observaram que não houve diferença significativa entre o número de CNVs identificadas no grupo de pacientes *BRCA1* positiva e o grupo controle. KREPISCHI et al. (2012a) compararam o número de CNVs identificadas em pacientes com diagnóstico precoce de câncer de mama, porém negativas

para mutação nos genes de predisposição *BRCA1* e *BRCA2*, com um grupo controle. Neste estudo, eles não observaram diferença entre o total e o tamanho de CNVs no grupo amostral quando comparado com o grupo controle. Porém, a proporção de CNVs raras nos pacientes foi maior do que na população controle.

Apesar do grupo 2 apresentar maior número de CNVs, a porcentagem de CNVs comuns, raras e novas raras identificadas nos dois grupos foi semelhante, aproximadamente 52%, 41% e 7%, respectivamente. O elevado número de CNVs raras e novas raras pode conferir as pacientes um risco aumentado de desenvolver a doença. KREPISCHI et al. (2012a) sugeriram que esse risco é proporcional ao número de CNVs raras identificadas no paciente.

Além disso, observou-se que a média de idade de desenvolvimento tumoral das pacientes do grupo 2 foi superior quando comparado com o grupo 1. Porém após a análise de CNVs nestas pacientes, verificou-se que o grupo 1 não apresentava CNVs compartilhadas entre elas e o grupo 2 apresentou CNVs comuns compartilhadas. Esse resultado sugere que as CNVs raras e novas raras identificadas nas pacientes sejam responsáveis pelo desenvolvimento tumoral.

Tanto no grupo 1 como no grupo 2 foi identificada uma CNV nova rara em mais de um paciente. No grupo 1, a alteração, mapeada em 14q23.1, envolveu o gene *SLC38A6*. No grupo 2, a alteração estava mapeada em 11p11.2 e envolveu a *C11orf49*.

A CNV nova rara, mapeada em 14q23.1 (**gene SLC38A6**), envolvida em ganho genômico, foi identificada nos pacientes SM83 e SM173 (ambos do grupo 1) e LFS144 (grupo 2).

O **gene SLC38A6** é composto por 17 éxons e é membro da superfamília carreadora de solutos (SLC). Esta superfamília compreende um grande grupo de proteínas transportadoras de membrana responsáveis pelo fluxo de nutrientes, metabólitos, drogas e toxinas. Os genes SLC codificam transportadores passivos e iônicos (HE et al. 2009; HÖGLUND et al. 2011). De acordo com URBAN et al. (2006), esses transportadores mantêm a homeostasia celular e corporal pela promoção da importação de nutrientes e exportação de componentes tóxicos celulares. Além disso, os autores relatam que eles desempenham um importante papel na resposta a drogas, podendo atuar como alvos terapêuticos, facilitando a absorção, metabolismo e eliminação dessas drogas. Alterações genéticas nos transportadores SLC têm sido associadas com algumas doenças Mendelianas, como doenças metabólicas e neurológicas. Os membros dessa família fazem parte de diversas classes funcionais, incluindo neurotransmissores e transportadores de nutrientes, metais pesados e xenobióticos (URBAN et al. 2006). SUNDBERG et al. (2008) demonstraram, por hibridação *in situ*, a expressão do gene *SLC38A6* em cérebro de camundongo.

A família de transportadores SLC38 codificam 11 transportadores denominados SNAT (do inglês, *sodium-coupled amino acid transporters*). HÄGGLUND et al. (2011) relataram que existem apenas cinco tipos de SNATs e que estes estão divididos em A (SLC38A1, SLC38A2, SLC38A4) e

N (SLC38A3 e SLC38A5), porém todos, exceto SLC38A4 (MACKENZIE e ERICKSON 2004), são transportadores de glutamina. A glutamina é o aminoácido de maior abundância no corpo e desempenha muitas funções, como síntese de proteína, produção de ATP, regulação do equilíbrio ácido-básico nos rins, doação de carbono e transportador não tóxico de amônia na circulação sanguínea. Segundo a literatura, o transporte de glutamina é maior em células tumorais do que normais (BODE et al. 2002). Além disso, nas células tumorais o nível de glutaminase, enzima responsável pelo metabolismo da glutamina, é maior, já que elas utilizam não só a glutamina, mas seus metabólitos para sobrevivência. YUNEVA et al. (2007) observaram que o aumento do metabolismo da glutamina acelera a proliferação e a necessidade por ATP de células normais e tumorais.

Com isso, o ganho genômico do gene *SLC38A6*, identificado nas pacientes (SM83, SM173 e LFS144) pode estar relacionado com o desenvolvimento tumoral, pois o ganho de transportadores de glutamina resultam em aumento do transporte desse aminoácido, aumento de glutamina e de seus metabólitos nas células, maior produção de ATP e, conseqüentemente, maior sobrevivência de células tumorais. Para avaliar o envolvimento desse gene com a predisposição dos tumores, seria necessário a triagem dessa CNV nos familiares das pacientes.

A CNV nova rara, mapeada em 11p11.2 (***C11orf49***), envolvida em ganho genômico, foi identificada nos pacientes SM98 (grupo 1), SM87 e SM88 (ambos do grupo 2). A *C11orf49* precisa ser melhor caracterizada em

estudos futuros para avaliar seu papel nos processos tumorais de mama ou cólon e predisposição a doença.

Entre as **CNVs novas raras exclusivas do grupo 1**, foram identificadas oito ganhos genômicos envolvendo seis regiões cromossômicas: 4q12 (*KIAA1211*), 6q24.3 (*SHPRH* e *GRM1*), 7p22.2 (*LFNG* e *MAD1L1*), 14q32.11 (*FOXN3* e *PRO1768*), 19q13.32 (*NPAS1*, *TMEM160* e *ZC3H4*), 21q22.3 (*C21orf70*, *TMPRSS3* e *UBASH3A*).

As CNVs descritas acima foram identificadas em quatro pacientes (SM26, SM98, SM173, VCS), sendo que alguns deles apresentaram mais de uma alteração (SM26, SM98 e VCS). As CNVs novas raras envolvendo as regiões cromossômicas 4q12 (*KIAA1211*) e 14q32.11 (*FOXN3* e *PRO1768*) foram identificadas na **paciente SM98**. Os ganhos genômicos, mapeados em 4q12 e 14q32.11, foram identificados nas regiões intrônicas dos genes *KIAA1211* (intron 2-3) e *FOXN3* (intron 1-2), respectivamente. O gene *KIAA1211* codifica uma proteína ainda não caracterizada e o gene *FOXN3* codifica uma proteína que atua como repressora da transcrição. Segundo a literatura, o aumento de expressão do gene *FOXN3* pode estar envolvido em processos tumorais, como renal, oral de células escamosas e de ovário, e na resposta a tratamento do câncer (SCOTT e PLON 2005). Como a alteração detectada na paciente SM98 é intrônica ela pode não ter papel funcional.

As alterações envolvendo as regiões cromossômicas 6q24.3 (*SHPRH* e *GRM1*), 7p22.2 (*MAD1L1*) e 19q13.32 (*NPAS1*, *TMEM160* e *ZC3H4*) foram identificadas na **paciente VCS**. Entre os genes envolvidos nessas

alterações, *GRM1*, *MAD1L1* e *NPAS1* foram descritos previamente em tumores de mama ou colorretal.

O gene *GRM1*, mapeado em 6q24, codifica um receptor de glutamato 1, membro da família de receptores transmembrana de proteínas G. Está altamente expresso no sistema nervoso central, sendo responsável por mediar a excitabilidade neuronal, a sinapse e a liberação de neurotransmissores. Além disso, está envolvido em processos patológicos e fisiológicos como aprendizado, formação de memória, neuro degeneração e dor (PIN e DUVOISIN 1995; DE BLASI et al. 2001; HERMANS e CHALLISS 2001). Recentes estudos sugerem o envolvimento desse gene em tumores, como melanoma (POLLOCK et al. 2003). Em 2007, ORTIZ et al. observaram que o gene *GRM1* estava altamente expresso em 7/19 amostras de melanoma e em 12/18 linhagens celulares desse tumor. Porém, não estava expresso nas células normais ou nos tumores benignos. Em 2012, um grupo de pesquisadores identificaram a expressão desse gene em linhagem celular de câncer de mama triplo negativo (SPEYER et al. 2012). O objetivo dos pesquisadores foi identificar a capacidade de proliferação dessas células com elevada expressão do gene. Para isso, utilizaram drogas para inibir a via glutamato-Grms e observaram a inibição das células tumorais. De acordo com os autores, essa inibição estava correlacionada com o aumento da apoptose. Os autores sugerem que os inibidores da via glutamato-Grms são importantes alvos para terapia do câncer de mama triplo negativo.

O gene ***MAD1L1***, mapeado em 7p22, é responsável pelo *checkpoint* durante a mitose, desempenhando um importante papel no ciclo celular.

Apesar de apresentar características de genes supressores tumorais, YUAN et al. (2006) verificaram um aumento na expressão do gene *MAD1L1* na linhagem celular de câncer mamário e de células primárias de mama. Segundo os autores, em nenhum momento o nível de expressão desse gene na linhagem de câncer de mama foi inferior do que nas células epiteliais normais de mama. Os autores sugerem que o aumento de expressão de genes responsáveis pelo *checkpoint* podem ser marcadores de presença de instabilidade cromossômica no câncer de mama.

O gene *NPAS1*, mapeado em 19q13.32, composto por 11 éxons, codifica uma proteína membro da família de fatores de transcrição. Sua função ainda não é totalmente conhecida, porém desempenha um importante papel no final da embriogênese e no desenvolvimento pós natal. Em 2008, um grupo de pesquisadores observaram, por aCGH, perda homozigota desse gene em linhagens celulares de câncer de mama (KOMATSU et al. 2008). Em seguida, os autores realizaram qPCR em 30 amostras microdissecadas de câncer de mama primário e identificaram deleção homozigota em 11/30 (36,7%) das amostras. Com o intuito de verificar se essas deleções eram exclusivas de tecidos tumorais, os autores realizaram qPCR em 30 amostras pareadas (tecido normal e tumoral da mesma paciente) de mama. As amostras tumorais com deleção homozigota também apresentaram essa alteração no tecido normal. Além disso, observou-se perda de uma cópia do gene em nove (30%) amostras tumorais e normais. Dessa maneira, eles sugeriram que essa seja uma região de polimorfismo frequentemente deletada em pacientes com câncer de mama.

Neste estudo, o ganho genômico identificado no gene *NPAS1* não pode ser associado ao desenvolvimento tumoral da paciente, pois seu envolvimento com câncer de mama pode ser resultado da perda de um ou dois alelos do gene, tanto em células normais como tumorais de mama. Por outro lado, o ganho nos genes *GRM1* e *MAD1L1* podem estar envolvidos com o desenvolvimento tumoral em idade precoce da paciente VCS. Pois, observou-se na literatura, que o aumento de expressão do gene *GRM1* contribui com a proliferação de células tumorais e do gene *MAD1L1* representa presença de instabilidade cromossômica no tumor. Sugere-se a triagem dessa alteração em familiares da paciente VCS e o estudo funcional desses genes para verificar o envolvimento dos mesmos na predisposição tumoral.

Os ganhos genômicos mapeados em 21q22.3 (*C21orf70*) e 7p22.2 (*LFNG*) foram identificadas na paciente SM26.

O **gene *LFNG***, mapeado em 7p22.2, codifica uma proteína que modula a ligação entre o receptor Notch 1-4 e seu ligante Delta 1-3 e Jagged 1 e 2 (THÉLU et al. 2002). Os genes Notch codificam uma proteína transmembrana que regula a divisão celular, diferenciação e sobrevivência de células tronco e/ou células progenitoras em vários tecidos, incluindo mama e cólon (CALLAHAN e EGAN 2004; FRE et al. 2005). REEDIJK et al. (2008) observaram que os genes *NOTCH1* e *LFNG* estão expressos em altos níveis em casos de CCR familiar e sugeriram que eles podem desempenhar um papel importante no desenvolvimento e progressão tumoral.

Apesar da alteração identificada nesse gene não ter envolvido três sondas consecutivas, o ganho genômico em *LFNG*, associado ao quadro clínico da paciente SM26, pode contribuir para o desenvolvimento de cânceres nessa família. Com isso, o papel do gene *LFNG* na síndrome de câncer de mama e colorretal precisa ser investigado em maiores detalhes.

A CNV nova rara, envolvida em ganho genômico, mapeada em 21q22.3 (*TMPRSS3* e *UBASH3A*) foi identificada na paciente SM173. O **gene *TMPRSS3***, mapeado em 21q22.3, codifica uma proteína pertencente a família de serina protease, as quais estão envolvidas em diversos processos biológicos. WALLRAPP et al. (2000) verificaram, por *Northern blot*, a expressão aumentada desse gene em câncer pancreático. Além disso, os autores identificaram uma correlação entre a expressão aumentada do transcrito e o potencial metastático de linhagens celulares de câncer pancreático. Com isso, os autores sugeriram seu envolvimento com invasão tumoral e metastase. Em 2004, um grupo de pesquisadores identificaram o aumento de expressão de uma nova variante do gene *TMPRSS3* (SAWASAKI et al. 2004). No estudo, foi avaliada a expressão da nova variante do gene *TMPRSS3* em 50 tumores ovarianos (41 adenocarcinomas, 3 de potencial maligno baixo e 6 adenomas) e sete tecidos normais de ovário. Os autores relataram um aumento de expressão do gene nos tecidos tumorais quando comparados com o normal. Além disso, observaram uma expressão aumentada em carcinomas do que em adenomas. Entre os carcinomas, foi identificado um aumento de expressão do gene *TMPRSS3* nos casos com estagio clínico avançado. Dessa maneira, os autores

sugeriram que a nova variante do gene *TMPRSS3* desenvolve um importante papel no desenvolvimento e progressão do câncer de ovário. Em 2012, GUERRERO et al. avaliaram o padrão de metilação em carcinoma de ovário. Entre os genes identificados, os autores verificaram que o gene *TMPRSS3* apresentava expressão aumentada nos tecidos tumorais de ovário. Segundo os autores, esse aumento de expressão é resultante da hipometilação das regiões de controle desse gene.

O gene ***UBASH3A***, mapeado em 21q22.3, composto por 15 éxons, codifica uma proteína altamente expressa em tecidos do sistema imune, como baço, timo, medula óssea e leucócitos do sangue periférico (WATTENHOFER et al. 2001). Não há relatos em literatura do envolvimento desse gene em tumores.

Em literatura, a expressão aumentada do gene *TMPRSS3* foi associada com o desenvolvimento e progressão de câncer de ovário, porém o gene não foi associado com a predisposição familiar. Segundo a história familiar de câncer da paciente, a tia paterna foi diagnosticada com câncer de ovário.

Apesar das alterações identificadas neste grupo serem “paciente-específica”, dois genes alterados neste grupo (*GRM1* e *TMPRSS3*) podem contribuir para o desenvolvimento e predisposição tumoral. Essas alterações foram identificadas em duas pacientes diferentes (VCS e SM173), ambas diagnosticadas com câncer de mama em idade precoce. Essas alterações precisam ser avaliadas em outros membros dessas famílias assim como investigar o seu papel funcional como genes de predisposição tumoral.

Entre as **CNVs novas raras exclusivas do grupo 2**, foram identificadas seis ganhos, envolvendo as regiões cromossômicas 3p14.1, 7p22.3, 13q14.3, 15q26.1, 17q25.1 e Xq13.1, e duas perdas genômicas, envolvendo as regiões 6p22.1 e 7q36.3. As regiões cromossômicas 1q23.3, 1q31.2, 5p15.2 e 16q21, todas envolvidas em perda genômica, e a 5q11.2, envolvida em ganho, não apresentaram genes conhecidos segundo a base de dados Hg18 (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway?db=hg18>). Após comparação com a base de dados Hg19 (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway?hgsid=273251913&clade=mammal&org=Human&db=hg19>), apenas a região 5p15.2 apresentou gene mapeado, denominado *TAG*.

As CNVs descritas acima foram identificadas em nove pacientes (SM6, SM7, SM37, SM63, SM77, SM87, SM88, SM150, SL16), sendo que alguns deles apresentaram mais de uma alteração (SM87 e SM88).

Os ganhos genômicos englobando as regiões 3p14.1 (*FOXP1*), 15q26.1 (*BLM*), 17q25.1 (*ACOX1*, *LOC100134934*, *CDK3*) e Xq13.1 (*ERCC6L*) foram identificadas na **paciente SM87**. Com exceção do gene *ERCC6L*, as sondas nos demais genes estavam mapeadas em regiões exônicas dos genes.

O gene *FOXP1*, mapeado na região 3p14.1, composto por 21 éxons, é membro de uma família de fatores de transcrição (FOX) que contém um domínio de ligação de DNA. Esses fatores de transcrição estão envolvidos em diversos processos celulares e desempenham um importante papel no desenvolvimento celular (LAI et al. 1991; KAUFMANN e KNÖCHEL 1996). O gene *FOXP1* possui aumento de expressão em tumores hematológicos,

como linfomas, além de uma associação com pior prognóstico da doença, sugerindo uma possível função de oncogene (KOON et al. 2007). Por outro lado, em alguns tecidos tumorais, como mama, pulmão, cabeça e pescoço, esse gene apresenta baixa expressão gênica, sugerindo sua atuação como supressor tumoral (KOON et al. 2007). BANHAM et al. (2001) relataram que esse gene possui expressão protéica aumentada em tecidos normais de cólon, pâncreas, rim, baço e ovário.

KOON et al. (2007) sugeriram que o aumento de expressão do gene *FOXP1* pode ser o resultado da translocação entre os genes *FOXP1* e o *IHG* (*Immunoglobulin heavy chain*), t(3;14), da trissomia do cromossomo 3 observada em linfoma ou o resultado de quebras na região codificadora do gene. BANHAM et al. (2001) estudaram o padrão de expressão protéica, por imunistoquímica, em 128 tumores sólidos (cólon, estômago, rim, pulmão, mama, cabeça e pescoço, pâncreas e próstata). Eles identificaram que 18/20 tumores de cólon apresentaram expressão protéica de *FOXP1* fraca ou ausente no núcleo. Além disso, eles observaram uma perda de marcação citoplasmática e aumento de marcação nuclear na transição entre o epitélio normal e o tumoral. Em tumores de mama, foi observada uma marcação nuclear forte em 3/9 casos, um caso teve marcação negativa e o restante apresentou marcação fraca. Os tumores de mama foram divididos em *in situ* com marcação forte e ductal com marcação fraca ou ausente.

RAYOO et al. (2009) investigaram a expressão de *FOXP1* em tumores mamários e correlacionaram com parâmetros clinopatológicos e presença de receptor estrógeno (ER). A reação de imunistoquímica foi

realizada em 126 tecidos tumorais de mama, sendo 35 *BRCA1* positivo, 34 *BRCA2* positivo e 57 sem a mutação no gene *BRCA* (esporádicos). Foi identificada marcação forte em 54% dos tumores familiares e em 46% dos esporádicos. Além disso, observou-se uma correlação significativa entre a marcação FOXP1 e os tumores ER positivos. Por outro lado, a ausência de expressão dessa proteína foi associada com baixa sobrevida e curto período livre de recidiva em tumores familiares de mama.

SHIGEKAWA et al. (2011) avaliaram a expressão de FOXP1 por imunohistoquímica em 133 tumores de mama. Neste estudo os autores identificaram que 67% dos tumores (89 casos) apresentaram marcação nuclear positiva para a proteína FOXP1 e estavam correlacionados positivamente com o grau tumoral e receptores hormonais, como estrógeno (ER) e progesterona (PgR). Em um estudo com linhagem celular de mama MCF-7, os autores observaram um aumento de expressão do mRNA do gene *FOXP1* após a ativação do receptor de estrógeno, sugerindo que a expressão de mRNA do gene *FOXP1* é regulada pelo ER em células tumorais de mama. Os autores também identificaram, por *western blotting*, um aumento da expressão protéica de FOXP1 após estímulo do ER. Com o intuito de verificar se o ganho ou perda de expressão do gene *FOXP1* contribui para o desenvolvimento de células tumorais em tecidos ER positivos, foi realizada a transfecção em células MCF-7 com pcDNA3-FOXP1-Myc, resultando no aumento de expressão do gene, e siRNA do gene FOXP1, promovendo a perda de expressão do gene. Na presença de ER, o aumento da expressão do gene *FOXP1* promoveu um aumento nas

taxas de crescimento celular quando comparadas com as células controle. Por outro lado, a perda de expressão do gene *FOXP1* interrompeu o crescimento celular.

Em 2012, um grupo de pesquisadores identificaram, por imunistoquímica, uma associação entre a marcação positiva da proteína *FOXP1* em tecidos tumorais mamários com um prognóstico favorável da doença e aumento da sobrevida em pacientes previamente tratados com tamoxifeno (IJICHI et al. 2012).

O gene *BLM*, mapeado em 15q26.1, codifica uma DNA helicase, que participa da replicação e reparo do DNA. Mutação no gene *BLM* está associada a Síndrome de Bloom (BS) caracterizada por baixa estatura, sensibilidade a luz, problemas de fertilização e predisposição ao desenvolvimento de alguns tumores em idade jovem, como leucemia linfocítica, linfoma e tumores de origem epitelial (THACKER 2005). A falta de atividade das helicases nas células de indivíduos com BS promove uma instabilidade genômica, caracterizada pelo aumento de recombinação somática, quebras cromossômicas e mutações gênicas (GRODEN et al. 1990; GRODEN e GERMAN 1992; GERMAN 1993).

TURLEY et al. (2001) identificaram, por imunistoquímica, que a proteína *BLM* se expressa em tecidos tumorais de origem linfóide e epitelial e, em tecidos normais na presença de células em proliferação, como tecido linfóide, pele e trato digestivo. Os tecidos tumorais de origem epitelial e linfóide, como tumores mamários, renais, pulmonares, colorretais e linfomas, apresentaram marcação nuclear intensa da proteína. Em 2010, FRANK et al.

avaliaram se a presença do polimorfismo P868L no gene *BLM* estaria associado com o desenvolvimento do câncer colorretal. Os autores observaram que pacientes com esse polimorfismo P868L apresentavam um risco aumentado de desenvolver câncer retal. Além disso, sugeriram que esse polimorfismo pode desempenhar um importante papel em estágios avançados do CCR. Em 2011, MIRZAEI et al. relataram que a expressão aumentada da proteína BLM é responsável pelo aumento significativo do acúmulo de rearranjos cromossômicos.

O gene *CDK3* (cyclin-dependent kinase 3), composto por 8 éxons, membro da família das CDKs, é responsável pela síntese de uma proteína serina/treonina quinase, responsável pelo controle da progressão celular pela interação com vários reguladores e substratos (MALUMBRES e BARBACID 2001). O gene *CDK3* é um importante regulador do ciclo celular, pois atua no início da fase G1, atingindo atividade intensa no final dessa fase, e com isso, desempenhando um importante papel na transição da fase G1 para S. Esse gene é expresso em vários tecidos normais e em linhagens celulares de alguns tumores, como glioblastoma e neuroblastoma (MEYERSON et al. 1992; SCHANG et al. 2002; REN e ROLLINS 2004). ZHENG et al. (2008) relataram a expressão protéica desse gene em 15 linhagens celulares diferentes e a maioria delas apresentou aumento de expressão, como células de glioblastoma, de câncer pulmonar, carcinoma colorretal, câncer de próstata, osteossarcoma, carcinoma epidermóide e melanoma.

Segundo dados da literatura, os genes *FOXP1*, *BLM* e *CDK3* estão direta ou indiretamente envolvidos no desenvolvimento dos tumores mamários ou colorretais. A expressão diminuída de ***FOXP1*** tem sido descrita em tumores de mama e de cólon, porém a expressão aumentada desse gene em associação com a presença dos receptores hormonais, estrógeno e progesterona, é responsável pelo aumento do crescimento de células tumorais mamárias. O gene ***BLM*** está envolvido com elevado risco de desenvolvimento de câncer retal e o aumento de sua expressão está associada com o aumento da instabilidade cromossômica e danos ao DNA. Dessa maneira, sugere-se que os ganhos detectados nos genes *FOXP1* e em *BLM* podem contribuir para o desenvolvimento de câncer colorretal e mamário, diagnosticados na paciente SM87.

A CNV nova rara, envolvida em perda genômica, englobando o gene *OR2J2*, um receptor olfatório, mapeado em 6p22.1, foi identificada no **caso SM77**. Segundo o quadro clínico da paciente, ela desenvolveu câncer de mama e colorretal aos 92 anos. Assim, é possível que várias alterações em genes críticos isoladamente já associados a tumores esporádicos possam ter papel no desenvolvimento dos tumores de mama e colorretal diagnosticados no caso SM77. Para verificar a associação dessas alterações na predisposição tumoral presente na família, será necessário a triagem de CNVs nos parentes.

A CNV nova rara 7p22.3 (*C7orf50*), envolvida em ganho genômico, foi identificada na paciente SL16. Por ser não ainda caracterizada há a necessidade de outros estudos para avaliar o papel desta *C7orf50* em

processos tumorais de mama ou cólon e predisposição a doença. Em resumo, os dados apresentados sugerem que o câncer colorretal e mamário sejam resultado de várias CNVs, incluindo as duas raras envolvendo os genes *UNCX* (ganho) e *ADAM5P* (perda).

A perda genômica em 5p15.2 (*TAG*) foi identificada no **caso SM88**. Este gene possui transcrito não codificante de 624 pb. Além dessa alteração, a paciente apresentou oito CNVs raras e duas CNVs novas raras, porém nenhuma delas apresentou gene com função conhecida. Estes resultados sugerem o envolvimento de várias CNVs raras no desenvolvimento tumoral de mama e cólon diagnosticados na paciente.

As alterações em 7q36.3, identificada na paciente SM6, e em 13q14.3, identificada na paciente SM37, serão discutidas no item 5.3 desta seção, pois também foram identificadas nos respectivos familiares.

Apesar das alterações identificadas neste grupo serem “paciente-específica”, alguns genes (por exemplo, *FOXP1* e *BLM*), têm potencial para contribuir para o desenvolvimento tumoral.

### **5.1.2 Casos com mutação**

Em 2008, SHLIEN et al. relataram que pacientes portadores da Síndrome de Li-Fraumeni positivos para mutações no gene *TP53* apresentaram maior número de alterações genômicas quando comparados com pacientes negativos para essa mutação. Além disso, os autores relataram que pacientes com mutação e com história familiar de câncer também apresentavam maior números de CNVs. Esse aumento no número

de CNVs também foi observado nas pacientes deste estudo que apresentaram mutação no gene *MLH1* (SM41 e SL36) e história familiar de câncer. Segundo KREPISCHI et al. (2012b) é difícil determinar se o elevado número de CNVs em pacientes com mutação em genes conhecidos é resultado de instabilidade cromossômica ou se essas alterações estão diretamente envolvidas no processo tumoral juntamente com a mutação conhecida. Os autores sugerem que essas duas hipóteses não são exclusivas, pois o elevado número de CNVs nesses pacientes pode ser resultado do início do câncer gerada pela mutação, mas também pode contribuir para o processo tumoral. Dessa maneira, o acúmulo de alterações pode resultar numa manifestação precoce ou mais severa da doença.

Nos pacientes com mutações não patogênicas, observou-se uma média de 7,5 CNVs por indivíduos. Os pacientes com mutações não patogênicas no gene *MLH1* (média de 9,0 CNVs por indivíduo), SM91 e SM98 (grupo 1), SM100 e SL55 (grupo 2), apresentaram 0, 18, 13 e 4 CNVs, respectivamente. Além da mutação *missense* no gene *MLH1*, o caso SM91 apresentou uma mutação silenciosa não patogênica no gene *MSH2*. Tanto a paciente como a irmã desenvolveram câncer de mama bilateral, a primeira aos 38 e 39 anos e a segunda, aos 26 anos.

Entre as cinco mutações não patogênicas identificadas no gene *MSH2* (média de 8,0 CNVs por indivíduo), uma (c.965G>A, p.G322D) foi observada em três casos não relacionados por parentesco (SM28, SM173 e SL154). Os casos SM28 e SM173 (grupo 1) desenvolveram câncer de mama aos 35 e 38 anos, respectivamente. O caso SL154 (grupo 2) desenvolveu

CCR aos 42 anos e câncer de mama aos 56. Na análise de aCGH, os três casos apresentaram um elevado número de CNVs, entre 7 a 10. As outras mutações identificadas (c.573C>T, p.L191L; c.984C>T, p.A328A; c.1168 C>T; p.L390F; c.1666T>C, p.L556L), foram observadas em outros três casos do grupo 1 (SM60, SM91 e SM92) e em um caso do grupo 2 (SM67). Os casos SM60 e SM92 apresentaram 5 e 6 CNVs totais, respectivamente. O primeiro foi diagnosticado com câncer de mama aos 40 anos e o segundo, CCR aos 47 anos. O caso SM67, com 4 CNVs, desenvolveu câncer de mama aos 48 anos e CCR aos 56.

Os pacientes com mutação não patogênica nos genes *MLH1* e *MSH2* apresentaram uma média de CNVs semelhante aos pacientes sem mutação, sugerindo que as mutações não patogênicas não são responsáveis pelo aumento da instabilidade cromossômica e não estão diretamente envolvidas no processo tumoral.

Por outro lado, as pacientes com mutação patogênica nos genes *BRCA1* (SM50, SM89 e SM102) e *BRCA2* (SM86) apresentaram baixo número de alterações genômicas. Foi observado uma média de 3,25 CNVs por indivíduo positivo para mutação nos genes *BRCAs* (variação entre 1 a 5 CNVs). Quando comparado com o grupo controle, verificou-se uma diminuição significativa no número de CNVs ( $p= 0,0190$ , Teste de Mann-Whitney). Porém, quando comparado com o grupo de pacientes com a doença, mas sem a mutação, observou-se um aumento no número de CNVs (média de 6,44 CNVs por indivíduo), embora não significativo ( $p= 0,1839$ ). Resultado semelhante foi relatado por YOSHIHARA et al. (2011).

### 5.1.3 Análise de CNVs entre os familiares

Neste estudo foram selecionados para análise de CNVs entre os familiares oito pacientes e 20 parentes de primeiro grau. Nas famílias SM6, SM26 e SM87 foram analisados os filhos das pacientes; nas famílias SM34 e SM56 foram analisados os irmãos; na família SM37 foram analisados filhos e irmão; na família SM83 foram analisados mãe e irmã. Na família SM89 foram analisados irmãs, sobrinha, tias e prima da paciente. As famílias SM56 e SM37 serão discutidas no item 5.3.1 e, a família SM89, no item 5.3.2.

Entre as famílias de pacientes sem mutação (SM6, SM26, SM34, SM37, SM56, SM83, SM87), foram identificadas 32 CNVs tanto nos pacientes como nos respectivos familiares, sendo 22 (68,8%) comuns, oito (25,0%) raras e duas (6,2%) novas raras. Na família com mutação no gene *BRCA1* (SM89), apenas quatro CNVs comuns foram observadas na paciente e nos familiares.

Na **família SM6** foram identificadas três CNVs comuns e uma nova rara na paciente e em pelo menos um parente (SM6.2 ou SM6.3). A CNV nova rara, mapeada em 7q36.3, envolvida em perda genômica, foi identificada na paciente SM6 e na filha SM6.3 (sem histórico de câncer até o presente). A deleção em 7q36.3 está localizada no íntron 1-2 do gene *PTPRN2* e engloba o microRNA 595.

O gene ***PTPRN2*** é composto por 23 éxons e codifica a proteína da família tirosina fosfatase (PTP). Essa família gênica regula uma variedade de processos celulares, como crescimento e diferenciação celular, ciclo celular

tendo sido relacionada ao desenvolvimento de tumores (NORDGARD et al. 2008). O gene *PTPRN2* se expressa no cérebro, pâncreas, glândula pituitária e uma isoforma se expressa no intestino. RUSH et al. (2004) relataram hipermetilação do gene *PTPRN2* em amostras de leucemia linfocítica crônica. Em um estudo de análise de metilação em células escamosas de carcinoma pulmonar e em células não tumorais adjacentes, ANGLIM et al. (2008) identificou oito genes hipermetilados nos tecidos de carcinoma pulmonar de estadio 1 e nos mais avançados. SELAMAT et al. (2011) relataram que o gene *PTPRN2* está frequentemente metilado em adenocarcinoma e carcinoma de células escamosas de pulmão.

Segundo o mirDIP: *microRNA Data Integration Portal* (<http://ophid.utoronto.ca/mirDIP/index.jsp>), o microRNA 595 possivelmente regula os genes *EP300* (score: 71,45), *FLRT2* (score: 68,01) e *NEK9* (score: 67,82). Entre eles, apenas o gene *EP300* foi relatado como envolvido em processos tumorais, incluindo mama e colorretal. Este gene, mapeado em 22p13.2, considerado supressor tumoral, codifica uma proteína que regula a transcrição pela via de remodelamento da cromatina. Além disso, é importante para a proliferação e diferenciação celular. A região cromossômica 22q, no qual o gene está mapeado, é uma região que apresenta frequente perda de heterozigose em diversos tumores, como mama, ovário, colorretal, gástrico e pancreático (CAMPBELL et al. 2004). Segundo a literatura, foram identificados nesse gene mutações somáticas *missense* em 27 tumores colorretais (MURAOKA et al. 1996). GAYTHER et al. (2000) identificaram duas mutações em tumores primários de mama e

colorretal, quatro em linhagem celular de câncer mamário, colorretal e pancreático. CAMPBELL et al. (2004) relataram que não é possível associar alterações germinativas do gene *EP300* com síndromes hereditárias de câncer, porém eles sugerem que além do câncer de mama, mutações germinativas nesse gene pode favorecer o desenvolvimento do câncer colorretal, já que algumas mutações somáticas em tumores primários de cólon já foram descritos pela literatura (MURAOKA et al. 1996; GAYTHER et al. 2000).

Como a alteração no gene *PTPRN2* estava mapeada em região intrônica, sugere-se que o desenvolvimento tumoral esteja relacionado a outros fatores, como perda do microRNA 595 e, possivelmente, ao acúmulo de CNVs identificadas na paciente SM6.

Entre as CNVs identificadas na **família SM26**, nove (sete comuns e duas raras) foram idênticas tanto na paciente como na filha SM26.2 (diagnosticada com câncer de mama aos 45 anos). As CNVs raras, mapeadas em 19p12 e Xq22.2, estavam envolvidas em perda e ganho genômico, respectivamente. A perda genômica em 19p12 englobou o pseudogene *ZNF826* (do inglês, *zinc finger protein 826*). Esse pseudogene é composto por 3 éxons e transcreve um RNA não codificante. A alteração em Xq22.2, envolvida em ganho genômico, englobou os genes *TMSB15B*, *H2BFXP* e *H2BFWT*. Entre eles, há relatos em literatura apenas do gene *TMSB15B* em processos tumorais. O gene *TMSB15B*, composto por 3 éxons, codifica uma proteína de ligação a actina e possui um importante papel na organização do citoesqueleto. Além disso, pode estar envolvido na

migração celular. BANYARD et al. (2009) identificaram um aumento de expressão do gene em linhagens celular específicas, como PC-3 (carcinoma de próstata), MDA-MB-231 (câncer de mama), NCI-H322 (câncer de pulmão) e Caco-2 (carcinoma colorretal). Os autores também observaram um aumento de expressão em tecido normal e tumoral de cólon.

Apesar da paciente SM26 e da filha SM26.2 terem apresentado uma CNV rara em comum, o desenvolvimento da doença pode ser resultado do acúmulo de CNVs raras e novas raras identificadas em cada uma delas.

Na **família SM34** foram identificadas duas CNVs comuns e quatro raras idênticas na paciente e em um dos familiares (SM34.2 e SM34.3). Todas a CNVs raras (3q29, 6q12, 13q21.32, 20p12.3) estavam envolvidas em perdas genômicas. A alteração em 3q29, identificada na SM34 e SM34.2 (diagnosticada com câncer de mama aos 64 anos), envolve os genes *BDH1*, *LOC220729*, *KIAA0226*, *FYTTD1* e *LRCH3* e o microRNA 922. A deleção em 13q21.32, identificada na SM34 e SM34.3 (sem história de câncer) não possui gene descrito (tanto na plataforma Hg18 como na Hg19). As perdas em 6q12 e 20p12.3 foram identificadas na SM34, SM34.2 e SM34.3 e envolvem os genes *EYS* e *PLCB1*, respectivamente.

Os genes identificados como alterados não foram, para o nosso conhecimento, descritos em literatura como envolvidos em processos tumorais. A alteração em 3q29 promoveu a perda dos genes *BDH1*, *LOC220729*, *KIAA0226* e *FYTTD1* e parte do gene *LRCH3*. O gene *BDH1* codifica uma proteína membro da família dehidrogenase e redutase, que cataliza os principais corpos cetônicos (acetoacetato e hidroxibutirato)

produzidos durante o catabolismo dos ácidos graxos. Os corpos cetônicos são utilizados como fonte de energia pelo coração e cérebro quando a quantidade de glicose disponível no corpo está diminuída. O KIAA0226 regula negativamente o tráfego das vias endocíticas e dificulta o processo de maturação dos autofagossomos. O gene LRCH3 codifica uma proteína com um domínio LRR (do inglês leucine-rich repeats) e um domínio CH (do inglês, calponin homology actin-binding). O domínio CH é responsável pela ligação com actina, que participa de diversos processos celulares, como contração muscular, motilidade celular, divisão celular, movimento de vesículas e organelas, sinalização celular e estabelecimento e manutenção das junções e do formato celular. A perda identificada neste estudo compromete a ligação da actina, pois a alteração está localizada na porção terminal do gene, o qual codifica o domínio CH. O gene FYTDD1 é responsável por expor os mRNAs do núcleo para o citoplasma. Ele participa da via DDX39B/UAP56-NFX1 com o intuito de garantir a exportação do mRNA e encaminhá-lo para o poro nuclear. A perda em 6q12 envolveu os éxons 13 ao 22 do gene EYS, composto por 43 éxons. Este codifica uma proteína que é expressa em células fotorreceptoras da retina e tem função de manter a integridade dessas células. Quando mutado, causa a retinite pigmentosa tipo 25, uma doença autossômica recessiva que promove a degeneração das células fotorreceptoras da retina. A deleção em 20p12.3 estava mapeada no íntron 2-3 do gene PLCB1, composto por 32 éxons. Este codifica uma proteína que cataliza a formação de 1,4,5-trifosfato inositol e diacilglicerol a partir do fosfatidilinositol 4,5-bifosfato. Essa reação utiliza

cálcio como um cofator e desempenha um importante papel na transdução de sinais intracelulares. Dessa maneira, a perda em 3q29 envolvendo os genes LRCH3 e FYTTD1 podem contribuir para a predisposição hereditária ao desenvolvimentos destes tumores.

Na **família SM83** foi identificada apenas uma CNV comum (1p31.1) na paciente SM83 e na irmã gêmea SM83.2. A alteração em 1p31.1, envolvida em ganho genômico, não apresentava gene mapeado conhecido (segundo o banco de dados do Hg18 e Hg19). Por se tratar de uma CNV comum e as parentes não terem sido diagnosticadas com a doença, sugere-se, inicialmente, que a CNV não tenha associação com o desenvolvimento nem predisposição a doença. Porém, estudos futuros nessa região cromossômica podem demonstrar a presença de genes de baixa penetrância responsáveis pelo desenvolvimento e predisposição a doença. Além dessa alteração, a paciente SM83 apresentou duas CNVs raras (*MGST1*, *LMO3* e *GALNTL6*) e uma nova rara (*SLC38A6*), as quais podem ter relevância no quadro clínico da paciente SM83.

Entre as CNVs identificadas na **família SM87**, apenas quatro (três comuns e uma rara) foram idênticas tanto na paciente SM87 como na filha SM87.2 (sem história de câncer). A alteração rara, envolvida em perda genômica e mapeada em 12q24.33, não apresentou gene mapeado no banco de dados Hg18, porém no Hg19 foi identificado o gene *BC042649*. Este possui um transcrito com 1.328 pb, porém não codifica proteína. Dessa maneira, sugere-se que a perda do gene *BC042649* pode ter associação com o desenvolvimento e predisposição tumoral. Porém estudos futuros

envolvendo essa região cromossômica podem identificar o papel funcional do gene. Além disso, o quadro clínico da paciente pode ser resultado da associação de CNVs, entre elas, a CNV nova rara (descrita no item 5.1.2) envolvendo os genes *FOXP1* e *BLM*.

## 5.2 ANÁLISE EM FAMÍLIAS EPECÍFICAS

### 5.2.1 Família SM56 (Grupo 1) e SM37 (Grupo 2)

A paciente **SM56** apresentou cinco CNVs, sendo duas comuns, duas raras e uma nova rara. A CNV nova rara envolveu o gene *ROBO1*, mapeado em 3p12.3. Essa perda genômica foi identificada na irmã, SM56.2, com diagnóstico de câncer de endométrio aos 58 anos. Esta foi a única CNV identificada tanto na paciente como no parente.

O caso **SM37** apresentou 11 alterações, sendo sete comuns, duas raras e duas novas raras. Entre as CNVs novas raras, foram identificadas uma perda e um ganho envolvendo as regiões 3p12.3 e 13q14.3, respectivamente. Entre os familiares, foi identificada perda em 3p12.3 na filha SM37.2 (diagnosticada com câncer de mama aos 55 anos) e ganho em 13q14.3 nos filhos SM37.3 e SM37.4 (sem histórico da doença).

O gene ***RCBTB1*** (*Regulator of Chromosome Condensation (RCC1) and BTB (POZ) Domain containing protein 1*), mapeado em 13q14.3 e envolvido em ganho genômico, é composto por 13 éxons. SOLOMOU et al. (2003) relataram que essa região encontra-se deletada em aproximadamente 50% dos pacientes com diagnóstico de leucemia

linfocítica crônica. De acordo com os autores, outras doenças malignas como linfoma não Hodgkin, carcinoma de cabeça e pescoço e carcinoma de células não pequenas de pulmão também apresentam essa região deletada. ZHOU e MÜNGER (2010) sugeriram que o gene *RCBTB1* é um candidato a supressor tumoral. Os autores identificaram baixa expressão do gene *RCBTB1* em linhagens celulares de câncer colorretal, cervical e linfoma. Além disso, observaram que o aumento da expressão do gene resultou na ativação da via de reparo ao DNA, promovendo a diminuição da viabilidade celular por meio de indução de apoptose. Neste estudo, foi identificado ganho genômico englobando o éxon 2 do gene *RCBTB1*. Segundo o site *UCSC Genome Bioinformatics* (<http://genome.ucsc.edu>), os éxons 1 e 2 desse gene são 5' UTR (do inglês, *untranslated region*). Segundo a literatura, o comprimento da região 5' UTR varia entre 18 a 210 nucleotídeos e alterações nesse comprimento podem prejudicar a eficiência da tradução e, conseqüentemente, a síntese protéica (PESOLE et al. 2000; CHATTERJEE e PAL 2009). CHATTERJEE e PAL (2009) relataram outro mecanismo, associado ao comprimento da região 5' UTR, de predisposição ao câncer de mama envolvendo a diminuição de expressão do gene supressor tumoral *BRCA1*. O gene *BRCA1* possui dois promotores diferentes (alfa e beta), os quais codificam dois transcritos diferentes com comprimentos da região 5' UTR diferentes. Segundo os autores, o transcrito de maior tamanho encontrado somente em tecido tumoral de mama, enquanto o menor, pode ser identificado tanto em tecido normal como tumoral de mama. Os autores relatam que a tradução do maior transcrito

tem sua eficiência 10 vezes reduzida quando comparada com o transcrito de menor tamanho. Com isso, ocorre a deficiência da expressão da proteína BRCA1, contribuindo para o desenvolvimento tumoral de mama.

Dessa maneira, a alteração identificada nessa região 5' UTR do *RCBTB1* pode estar envolvido com o desenvolvimento tumoral da paciente e a suscetibilidade ao câncer entre os familiares afetados.

As pacientes SM56 (câncer de mama aos 50 anos) e SM37 (CCR e câncer de mama aos 52 e 73 anos, respectivamente) apresentaram a mesma CNV nova rara mapeada na região 3p12.3, englobando o gene *ROBO1*, envolvida em perda genômica. Além das pacientes, essa alteração também foi identificada nos respectivos familiares SM56.2 e SM37.2, ambas com história de câncer.

O gene ***ROBO1/DUTT1***, mapeado em 3p12.3, composto por 31 éxons, codifica um receptor transmembrana pertencente a família de receptores de moléculas de adesão celular neural. A proteína ROBO1 apresenta uma porção extracelular N-terminal que consiste em um domínio formado por cinco repetições de imunoglobulina-like (Ig) e um domínio de três repetições de fibronectina tipo 3 (FN3), seguido da porção transmembrana e da porção intracelular C-terminal, formada por quatro repetições citoplasmáticas (CC0-CC3) (CHÉDOTAL 2007; HOHENESTER 2008; LEGG et al. 2008). Enquanto os domínios Ig1 e Ig2 são necessários para a ligação da proteína Slit2 codificada pelo gene *SLIT*, responsável pelo desenvolvimento do sistema nervoso central, o domínio citoplasmático não possui uma função específica. Porém, CC0 e CC1 apresentam um sítio de

fosforilação de tirosina e CC2 e CC3 apresentam sequências ricas em prolina. Além disso, CC1 liga-se ao domínio P3 do receptor netrina-1 DCC (do inglês, *deleted in colorectal cancer*) e CC3 liga-se as GTPases (CHÉDOTAL 2007).

Em 2001, XIAN et al. demonstraram que a deleção dos sítios de ligação Ig1 e Ig2 da proteína ROBO1 resulta no desenvolvimento anormal do pulmão. Posteriormente os autores (XIAN et al. 2004) observaram que a ligação de anticorpos ao domínio Ig1 promove a inibição do crescimento tumoral *in vivo*.

Estudos genéticos e bioquímicos têm identificado proteínas citoplasmáticas que participam ou modulam a sinalização do Slit através da ligação aos domínios citoplasmáticos da proteína ROBO1, como Abl (do inglês, *Abl tyrosine kinase*) e GTPases da família Rho (CHÉDOTAL 2007; HOHENESTER 2008). Abl tem um efeito negativo na sinalização Slit-Robo. Ao se ligar ao domínio citoplasmático CC0 e CC1, promove a fosforilação e inativação do ROBO1. Porém, de acordo com KHUSIAL et al. (2010), Src é responsável pela ativação da Abl, que promove a estabilização da proteína ROBO1 e o aumento da atividade das GTPases Cdc42 e Rac1, gerando assim, a migração de células transformadas. A inibição da atividade da Abl é responsável pela diminuição do nível de proteína ROBO1 e inibição da migração de células transformadas. Além disso, os autores demonstraram que a inibição da sinalização ROBO1 promove a inibição da migração de células tumorais sem interferir na atividade da Abl.

As GTPases são responsáveis pela modulação do citoesqueleto e desempenham um papel central no crescimento de axônios e migração celular (CHÉDOTAL 2007). A proteína srGAP1 liga-se ao domínio citoplasmático CC3 de ROBO1 e promove a inativação da proteína GTPase Cdc42 (do inglês, *cell division cycle 42*). Por outro lado, a proteína Dock/Nck se liga ao domínio CC2 ou CC3 promovendo a ativação de outra GTPase, Rac (HOHENESTER 2008).

Além de participarem do desenvolvimento do sistema nervoso, os genes *ROBO1* e *SLIT2* são importantes para o desenvolvimento pulmonar, renal e da glândula mamária. De acordo com CHÉDOTAL et al. (2005), esses genes estão envolvidos em algumas doenças humanas, como inflamação e câncer.

O gene *ROBO1*, candidato a supressor tumoral (DALLOL et al. 2002; ARAKAWA 2004; XIAN et al. 2004), é expresso em tecidos neurais, glândula mamária, coração, pulmão, pâncreas, placenta, próstata e músculo esquelético. Ele está envolvido nos processos biológicos de adesão, diferenciação e migração celular. Em 2009, SHEN et al. relataram que o tratamento com anticorpo monoclonal que se liga ao receptor ROBO1, impedindo a interação Slit-Robo, inibe o crescimento e a angiogênese tumoral, demonstrando que este é um importante processo no desenvolvimento de carcinomas de células escamosas.

Por ser considerado um gene supressor tumoral, alterações moleculares como a inativação (por exemplo, por hipermetilação) ou a expressão diminuída do transcrito do gene *ROBO1* (por exemplo, deleção)

poderiam resultar na desorganização celular e tecidual, como é visto no desenvolvimento de estágios pré-invasivos tumorais (SUNDARESAN et al. 1998; GHOSH et al. 2009). SUNDARESAN et al. (1998) sugeriram que a deleção do gene é um evento precoce no desenvolvimento do câncer pulmonar semelhante ao descrito em outros tumores, como displasias epiteliais (CHUNG et al. 1995; HUNG et al. 1995; GHOSH et al. 2009). DALLOL et al. (2002) relataram que a inativação do gene por LOH (perda de heterozigose) e hipermetilação é freqüentemente encontrado em cânceres pulmonares, renais e mamários. Os autores também relataram que a deleção do gene *ROBO1* foi detectada em duas linhagens celulares de câncer de pulmão e em uma de mama. Em um estudo com roedores, XIAN et al. (2004) demonstraram a importância do gene *ROBO1* como supressor tumoral. Entre os animais homozigotos *ROBO1*<sup>-/-</sup>, 63% morreram de insuficiência respiratória devido ao desenvolvimento anormal do pulmão e o restante sobreviveu até um ano de idade, porém desenvolveram hiperplasia dos brônquios. Entre os heterozigotos (*ROBO1* +/-), observou-se que os animais desenvolveram linfoma e carcinoma invasivo de pulmão no segundo ano de vida. Os autores realizaram qRT-PCR e imunistoquímica para verificar a expressão gênica e protéica de *ROBO1*. No primeiro experimento não foi identificada expressão gênica e, no segundo, 9/12 tecidos tumorais de pulmão apresentaram expressão muito fraca. Com isso, os autores sugeriram que o outro alelo pode estar hipermetilado.

Mais recentemente, GHOSH et al. (2009) observaram uma freqüente inativação bialélica resultante de deleção e metilação nesse gene em

carcinomas primários de cabeça e pescoço. Neste estudo, os autores identificaram uma correlação entre as alterações moleculares, como deleção (analisada por LOH) e metilação (analisada por MS-PCR), do gene *ROBO1* com o padrão de expressão do mRNA e da proteína.

Outros autores descreveram que o padrão de expressão do gene *ROBO1* é controlado por metilação em cânceres colorretais (DALLOL et al. 2002, 2003; NARAYAN et al. 2006). Em conjunto, estes dados indicam que tanto a deleção quanto a inativação por metilação do gene *ROBO1* foram detectados em carcinomas mamários e colorretais esporádicos.

Para o nosso conhecimento, este é o primeiro relato de perdas do gene *ROBO1* como um evento constitucional associado à Síndrome do Câncer de mama e cólon e ao desenvolvimento tumoral. Como trata-se de uma alteração envolvendo a perda de um gene supressor tumoral que segrega entre os familiares com diagnóstico de câncer, é possível que a perda por deleção e a metilação aberrante sejam os dois eventos essenciais para a inativação deste gene supressor tumoral e que estas alterações estejam relacionadas à predisposição hereditária ao desenvolvimento destes tumores. Porém, como não foi possível obter os tecidos tumorais das pacientes, a análise de metilação não pôde ser realizada.

A análise de sequenciamento do gene *ROBO1* não revelou mutação em ponto nos casos avaliados. De acordo com CHÉDOTAL et al. (2005), até o momento, não foi identificada nenhuma mutação somática em ponto no gene *ROBO1* em tecidos tumorais.

Para a confirmação da deleção por aCGH como evento primário para o desenvolvimento e predisposição dos tumores de mama e cólon, foram realizadas duas análises de amplificação do DNA genômico: a primeira, nas regiões flanqueadas pelas sondas envolvidas em perdas nos pacientes e em seus familiares e, a segunda, na região do éxon mais próximo as sondas alteradas.

No primeiro experimento foram utilizados dois pares de iniciadores, o primeiro englobando uma das sondas mapeadas na região intrônica e o segundo englobando a sonda mapeada no éxon mais próximo da região alterada. A alteração na região intrônica foi confirmada no caso SM37 e na parente SM37-2. Já a região contendo a sonda exônica foi considerada normal, ou seja, sem alteração no número de cópias. No segundo experimento foram utilizados seis pares de iniciadores flanqueando todo o éxon 4, incluindo regiões intrônicas (anterior e posterior ao éxon), exônicas e sítios de *splicing* alternativo. Foi observado que a perda intrônica identificada no caso SM37 e na parente SM37.2 estendeu-se até o éxon 4, resultando possivelmente numa proteína truncada, com a perda do domínio Ig-like I, domínio de ligação com a proteína SLIT2.

A análise da expressão da proteína ROBO1 foi realizada no tecido normal adjacente ao tumor da paciente SM37 e em amostras independentes de carcinoma mamário e colorretal hereditários. No tecido normal, usado como controle, identificou-se marcação forte da proteína, um dado relatado no *The Human Protein Atlas* ([www.proteinatlas.org](http://www.proteinatlas.org)). Nas amostras independentes de carcinoma mamário e colorretal provenientes de pacientes

com história familiar avaliadas no TMA, foi identificada uma associação não significativa entre a expressão protéica ausente e fraca com características de pior prognóstico, como tamanho tumoral (3 e 4), comprometimento de linfonodos, estadiamento III-IV e grau tumoral 2-3. Os achados desse estudo corroboram com os dados descritos em literatura. WANG et al. (2011) estudaram a expressão protéica ROBO1 em pacientes com câncer de mama com presença ou ausência de metástase cerebral. Os autores não identificaram uma associação significativa entre o padrão de expressão da proteína com tamanho tumoral, envolvimento linfonodal, estadio e grau histológico, porém relataram que pacientes com carcinoma mamário invasivo ou ductal *in situ* apresentavam um padrão de marcação inferior ao observado nas pacientes com adenofibroma (59,1%, 45,3% e 87,0%, respectivamente). O mesmo aconteceu quando os autores compararam pacientes com metástase cerebral e sem metástase (12,5% e 56,3%, respectivamente). Os autores sugeriram o uso desse gene como marcador prognóstico do câncer de mama invasivo e metástase cerebral.

Apesar deste estudo não ter identificado o segundo evento (por falta de material biológico), foi possível confirmar a deleção do gene ROBO1. Além disso, foi demonstrada a expressão protéica fraca ou ausente da proteína ROBO1 em casos de cânceres de mama e colon hereditários. Assim, baseados em nossos resultados e em dados da literatura é possível que a deleção de um alelo e hipermetilação do outro, estejam associados a predisposição hereditária ao cancer nestas famílias. Estudos funcionais são necessários para confirmar essa hipótese.

### 5.2.2 Família SM89

A família da paciente SM89 foi convidada a participar do estudo após a confirmação de mutação no gene *BRCA1* e a identificação de alterações genótípicas (pela metodologia de aCGH) e fenotípicas (após anamnese).

Participaram deste estudo seis parentes da probanda, sendo dois com história pessoal positiva de câncer (SM89.3 e SM89.4) e, os demais, sem evidência da doença (SM89.2, SM89.5, SM89.6, SM89.7). Foram realizadas análises para verificar se as alterações genômicas, como presença de CNVs e mutação no gene *BRCA1*, segregavam entre os familiares. Além disso, foi realizada análise cromossômica para verificar uma possível associação com as características fenotípicas, identificadas em mais de um indivíduo da família.

Tanto a paciente SM89 como os familiares, positivos para mutação no gene *BRCA1*, apresentaram um número baixo de CNVs, variando de 3 a 5. Os familiares, negativos para essa mutação, apresentaram um número entre 3 a 20 CNVs. Como citado acima, esses dados corroboram com o trabalho de YOSHIHARA et al. (2011).

As pacientes portadoras da mutação em *BRCA1* (SM89, SM89.4, SM89.5) não apresentaram CNVs idênticas, porém a SM89 e SM89.4, ambas com diagnóstico de câncer de mama e com histórico de aborto espontâneo, apresentaram um ganho genômico envolvendo a região cromossômica Xp22.2, porém não possuíam o mesmo tamanho. Segundo a literatura, a presença de mutação no gene *BRCA1* não está associado com o aumento no risco de aborto espontâneo (Friedman et al. 2006). Os autores

também demonstraram que pacientes com histórico de aborto espontâneo não possuem risco aumentado de desenvolver câncer de mama.

Além da identificação de alterações genômicas no sangue periférico da probanda, realizou-se a triagem de CNVs no tecido tumoral (carcinoma ductal invasivo) da paciente. As alterações identificadas no sangue também foram identificadas no tecido tumoral. BAE et al. (2010) também observaram uma concordância entre o número de cópias genômicas identificadas no DNA sanguíneo de pacientes com câncer de mama e no DNA tumoral das mesmas. De acordo com os autores, apesar de ser necessário mais estudos para a confirmação do uso de sangue periférico na triagem de genes possivelmente associados com o desenvolvimento de tumores primários de mama, os resultados encontrados no estudo demonstram a eficiência da reação de CGH *array* para identificação de CNVs no sangue periférico, no caso de ausência de tecido tumoral.

Neste estudo, observou-se uma diferença no número de CNVs identificadas no sangue periférico (5 CNVs) e no tecido tumoral (165 CNVs). Segundo SHLIEN e MALKIN (2009) há uma diferença nas regiões de CNVs nos pacientes com câncer hereditário ou esporádico. De acordo com o estudo, pessoas saudáveis apresentam um número baixo de CNVs no genoma, enquanto pacientes com risco aumentado de desenvolver tumor em idade jovem, apresentam um número excessivo ou aumentado de CNVs no genoma. Dessa maneira, é possível identificar, no sangue periférico de pacientes com mutação em genes de predisposição, a presença de CNVs herdadas e adquiridas. Já no tecido tumoral é possível identificar as CNVs

herdadas, adquiridas e aquelas tumor-específicas (adquiridas durante o desenvolvimento tumoral). Portanto, o número de CNVs no tecido é maior do que no sangue periférico.

Diante das características fenotípicas peculiares (hábito longilíneo, fenda palpebral discretamente oblíqua descendente, nariz longo com ponta proeminente e hipoplasia de asas nasais, palato alto, prognatia discreta, pescoço alado e curto, implantação baixa de cabelos em nuca, mãos com dedos alongados e clinodactilia do 3º e 4º dedos e, pés com dedos alongados e clinodactilia do 4º dedo) identificadas em três indivíduos (SM89, SM89.4 e SM89.5), da ausência de CNVs comuns entre elas e da limitação da técnica de CGH *array* em identificar translocações e fusões cromossômicas, foi realizada a análise cromossômica em todos os membros da família SM89. Nessa análise, foi verificada a presença de cromossomos marcadores, rearranjos estruturais e fusões cromossômicas, revelando grande instabilidade genômica. Porém apenas os casos SM89, SM89.4 e SM89.5 (fenótipo típico e positivos para mutação em *BRCA1*) apresentaram pequenos cromossomos marcadores em mosaicismo.

Segundo a literatura, a deficiência das proteínas BRCA1 e BRCA2 resultam em perda da recombinação homóloga, um processo de reparação conservativo do DNA, promovendo uma reparação inadequada do DNA e resultando em instabilidades genômicas como aumento de deleções, translocações e fusões cromossômicas (VENKITARAMAN 2002; WALSH et al. 2008). Apesar dessas instabilidades genômicas serem resultado da deficiência das proteínas BRCA1 e BRCA2, translocações e fusões

cromossômicas foram observadas tanto no grupo positivo como negativo para mutação no gene BRCA1. Porém, essas instabilidades apresentaram maior frequência no grupo das portadoras de mutação.

Este achado é inédito em literatura e apresenta evidências de uma nova síndrome genética associada com a presença de um marcador cromossômico e sinais fenotípicos específicos.

## 6 CONCLUSÕES

- ✓ Após a comparação das alterações identificadas nos pacientes do grupo 1 e do grupo 2 com o grupo controle, foi possível classificá-las em comuns, raras e novas raras. As CNVs raras e novas raras podem conter genes associados com a Síndrome de Cancer de Mama e Colorretal Hereditária.
- ✓ Em oito famílias, envolvendo 20 parentes, foram identificadas CNVs raras e novas raras nos pacientes e seus respectivos parentes. A família SM6 apresentou uma deleção englobando o hsa-mir-595. Na família SM37 observou-se duas CNVs novas raras, envolvendo os genes *RCBTB1* (5' UTR) e *ROBO1*. A família SM56 também apresentou uma deleção envolvendo o gene *ROBO1*. Esses genes são fortes candidatos a predisposição hereditária ao cancer de mama e colorretal. Nas demais famílias, sugere-se que o acúmulo de CNVs esteja relacionado a predisposição tumoral.
- ✓ Os resultados obtidos nas pacientes do grupo 1, sugerem que os genes *GRM1*, *MAD1L1* e *TMPRSS3* estejam associados com o câncer de mama diagnosticado em idade precoce nas pacientes VCS (genes *GRM1* e *MAD1L1*) e SM173 (gene *TMPRSS3*).

- ✓ A paciente SM87 (grupo 2) apresentou alterações nos genes *FOXP1* e *BLM*. Estudos adicionais são necessários para verificar o papel desses genes na predisposição tumoral.
  
- ✓ Foi identificada a deleção do gene *ROBO1* em dois pacientes de famílias não aparentadas (SM56 e SM37) e em membros dessas famílias com diagnóstico de câncer de mama e de endométrio. Sugere-se que esse seja um gene candidato para a predisposição da Síndrome do Câncer de Mama-Cólon Hereditário.
  
- ✓ Foi detectado ganho do gene *SLC38A6* em duas pacientes do grupo 1 e uma do grupo 2. Este gene codifica uma proteína de membrana, responsável pelo transporte de glutamina, importante no metabolismo celular. Serão necessários estudos futuros para verificar uma possível associação deste gene com a predisposição tumoral.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agarwal N, Ulahannan MJ, Mandile MA, Cayten CG, Pitchumoni CS. Increased risk of colorectal cancer following breast cancer. **Ann Surg** 1986; 203:307-10.

Anglim PP, Galler JS, Koss MN, et al. Identification of a panel of sensitive and specific DNA methylation markers for squamous cell lung cancer. **Mol Cancer** 2008; 7:62.

[Anonymous]. Cancer risks in BRCA2 mutation carriers. The Breast Cancer Linkage Consortium. **J Natl Cancer Inst** 1999; 91:1310-6.

Arakawa H. Netrin-1 and its receptors in tumorigenesis. **Nat Rev Cancer** 2004; 4:978-87.

Atkin WS, Edwards R, Kralj-Hans I, et al. Once-only flexible sigmoidoscopy screening in prevention of colorectal cancer: a multicentre randomised controlled trial. **Lancet** 2010; 375:1624-33.

Backes FJ, Cohn DE. Lynch syndrome. **Clin Obstet Gynecol** 2011; 54:199-214.

Bae JS, Choi JS, Baik SH, et al. Genomic alterations of primary tumor and blood in invasive ductal carcinoma of breast. **World J Surg Oncol** 2010; 8:32.

Banham AH, Beasley N, Campo E, et al. The FOXP1 winged helix transcription factor is a novel candidate tumor suppressor gene on chromosome 3p. **Cancer Res** 2001; 61:8820-9.

Banyard J, Barrows C, Zetter BR. Differential regulation of human thymosin beta 15 isoforms by transforming growth factor beta 1. **Genes Chromosomes Cancer** 2009; 48:502-9.

Beckmann JS, Estivill X, Antonarakis SE. Copy number variants and genetic traits: closer to the resolution of phenotypic to genotypic variability. **Nat Rev Genet** 2007; 8:639-46.

Bianchi F, Raponi M, Piva F, et al. An intronic mutation in MLH1 associated with familial colon and breast cancer. **Fam Cancer** 2011; 10:27-35.

Blokhuis MM, Goldberg PA, Pietersen GE, et al. The extracolonic cancer spectrum in females with the common 'South African' hMLH1 c.C1528T mutation. **Fam Cancer** 2008; 7:191-8.

Bode BP, Fuchs BC, Hurley BP, et al. Molecular and functional analysis of glutamine uptake in human hepatoma and liver-derived cells. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol** 2002; 283:G1062-73.

Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, et al. 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** 1998; 58:5248-57.

Boland CR. Molecular screening for Lynch syndrome. **Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol** 2005; 2:392-3.

Boyd J, Rhei E, Federici MG, et al. Male breast cancer in the hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome. **Breast Cancer Res Treat** 1999; 53:87-91.

Braude I, Vukovic B, Prasad M, et al. Large scale copy number variation (CNV) at 14q12 is associated with the presence of genomic abnormalities in neoplasia. **BMC Genomics** 2006; 7:138.

Buerki N, Gautier L, Kovac M, et al. Evidence for breast cancer as an integral part of Lynch syndrome. **Genes Chromosomes Cancer** 2012; 51:83-91.

Burke W, Daly M, Garber J, et al. Recommendations for follow-up care of individuals with an inherited predisposition to cancer. II. BRCA1 and BRCA2. Cancer Genetics Studies Consortium. **JAMA** 1997; 277:997-1003.

Callahan R, Egan SE. Notch signaling in mammary development and oncogenesis. **J Mammary Gland Biol Neoplasia** 2004; 9:145-63.

Campbell IG, Choong D, Chenevix-Trench G, Kathleen Cuninghame Foundation Consortium for Research into Familial Breast Cancer. No germline mutations in the histone acetyltransferase gene EP300 in BRCA1 and BRCA2 negative families with breast cancer and gastric, pancreatic, or colorectal cancer. **Breast Cancer Res** 2004; 6:R366-71.

Case AS, Zigelboim I, Mutch DG, et al. Clustering of Lynch syndrome malignancies with no evidence for a role of DNA mismatch repair. **Gynecol Oncol** 2008; 108:438-44.

Chatterjee S, Pal JK. Role of 5'- and 3'-untranslated regions of mRNAs in human diseases. **Biol Cell** 2009; 101:251-62.

Chédotal A, Kerjan G, Moreau-Fauvarque C. The brain within the tumor: new roles for axon guidance molecules in cancers. **Cell Death Differ** 2005; 12:1044-56.

Chédotal A. Slits and their receptors. **Adv Exp Med Biol** 2007; 621:65-80.

Chung GT, Sundaresan V, Hasleton P, Rudd R, Taylor R, Rabbitts PH. Sequential molecular genetic changes in lung cancer development. **Oncogene** 1995; 11:2591-8.

da Silva FC, de Oliveira LP, Santos EM, et al. Frequency of extracolonic tumors in Brazilian families with Lynch syndrome: analysis of a hereditary colorectal cancer institutional registry. **Fam Cancer** 2010; 9:563-70.

Dallol A, Forgacs E, Martinez A, et al. Tumour specific promoter region methylation of the human homologue of the Drosophila Roundabout gene DUTT1 (ROBO1) in human cancers. **Oncogene** 2002; 21:3020-8.

Dallol A, Morton D, Maher ER, Latif F. SLIT2 axon guidance molecule is frequently inactivated in colorectal cancer and suppresses growth of colorectal carcinoma cells. **Cancer Res** 2003; 63:1054-8.

De Blasi A, Conn PJ, Pin J, Nicoletti F. Molecular determinants of metabotropic glutamate receptor signaling. **Trends Pharmacol Sci** 2001; 22:114-20.

de Jong MM, Nolte IM, Te Meerman GJ, et al. Colorectal cancer and the CHEK2 1100delC mutation. **Genes Chromosomes Cancer** 2005; 43:377-82.

de la Chapelle A. The incidence of Lynch syndrome. **Fam Cancer** 2005; 4:233-7.

de Leeuw WJ, van Puijenbroek M, Tollenaar RA, Cornelisse CJ, Vasen HF, Morreau H. Correspondence re: A. Müller et al. Exclusion of breast cancer as an integral tumor of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer Res.*, 62: 1014-1019, 2002. **Cancer Res** 2003; 63:1148-9.

Diskin SJ, Hou C, Glessner JT, et al. Copy number variation at 1q21.1 associated with neuroblastoma. **Nature** 2009; 459:987-91.

Dominguez MV, Bastos EP, Silva SD, Rossi BM. [Molecular research methods in the detection of germinal mutations in hereditary colorectal cancer]. **Rev Gastroenterol Peru** 2009; 29:247-53.

Estivill X, Armengol L. Copy number variants and common disorders: filling the gaps and exploring complexity in genome-wide association studies. **PLoS Genet** 2007; 3:1787-99.

Fanciulli M, Petretto E, Aitman TJ. Gene copy number variation and common human disease. **Clin Genet** 2010; 77:201-13.

Fearon ER. Human cancer syndromes: clues to the origin and nature of cancer. **Science** 1997; 278:1043-50.

Fletcher O, Houlston RS. Architecture of inherited susceptibility to common cancer. **Nat Rev Cancer** 2010; 10:353-61.

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

Franco A, Sikalidis AK, Solís Herruzo JA. Colorectal cancer: influence of diet and lifestyle factors. **Rev Esp Enferm Dig** 2005; 97:432-48.

Frank B, Hoffmeister M, Klopp N, Illig T, Chang-Claude J, Brenner H. Colorectal cancer and polymorphisms in DNA repair genes WRN, RMI1 and BLM. **Carcinogenesis** 2010; 31:442-5.

Fre S, Huyghe M, Mourikis P, Robine S, Louvard D, Artavanis-Tsakonas S. Notch signals control the fate of immature progenitor cells in the intestine. **Nature** 2005; 435:964-8.

Friedman E, Kotsopoulos J, Lubinski J, et al. Spontaneous and therapeutic abortions and the risk of breast cancer among BRCA mutation carriers. **Breast Cancer Research** 2006; 8:R15.

Fuqua SA. The role of estrogen receptors in breast cancer metastasis. **J Mammary Gland Biol Neoplasia** 2001; 6:407-17.

Gala M, Chung DC. Hereditary colon cancer syndromes. **Semin Oncol** 2011; 38:490-9.

Garg K, Soslow RA. Lynch syndrome (hereditary non-polyposis colorectal cancer) and endometrial carcinoma. **J Clin Pathol** 2009; 62:679-84.

Gayther SA, Batley SJ, Linger L, et al. Mutations truncating the EP300 acetylase in human cancers. **Nat Genet** 2000; 24:300-3.

German J. Bloom syndrome: a mendelian prototype of somatic mutational disease. **Medicine (Baltimore)** 1993; 72:393-406.

Ghosh S, Ghosh A, Maiti GP, et al. Alterations of ROBO1/DUTT1 and ROBO2 loci in early dysplastic lesions of head and neck: clinical and prognostic implications. **Hum Genet** 2009; 125:189-98.

Groden J, Nakamura Y, German J. Molecular evidence that homologous recombination occurs in proliferating human somatic cells. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1990; 87:4315-9.

Groden J, German J. Bloom's syndrome. XVIII. Hypermutable at a tandem-repeat locus. **Hum Genet** 1992; 90:360-7.

Guerrero K, Wang Z, Bachvarova M, et al. A novel genome-based approach correlates TMPRSS3 overexpression in ovarian cancer with DNA hypomethylation. **Gynecol Oncol** 2012; 125:720-6.

Häggglund MG, Sreedharan S, Nilsson VC, et al. Identification of SLC38A7 (SNAT7) protein as a glutamine transporter expressed in neurons. **J Biol Chem** 2011; 286:20500-11.

Hampel H, Sweet K, Westman JA, Offit K, Eng C. Referral for cancer genetics consultation: a review and compilation of risk assessment criteria. **J Med Genet** 2004; 41:81-91.

Hastings PJ, Lupski JR, Rosenberg SM, Ira G. Mechanisms of change in gene copy number. **Nat Rev Genet** 2009; 10:551-64.

He L, Vasiliou K, Nebert DW. Analysis and update of the human solute carrier (SLC) gene superfamily. **Hum Genomics** 2009; 3:195-206.

Hermans E, Challiss RA. Structural, signalling and regulatory properties of the group I metabotropic glutamate receptors: prototypic family C G-protein-coupled receptors. **Biochem J** 2001; 359(Pt 3):465-84.

Hirshfield KM, Rebbeck TR, Levine AJ. Germline mutations and polymorphisms in the origins of cancers in women. **J Oncol** 2010; 2010:297671.

Hodgson D, Acher P, Cahill D. An update on localised prostate cancer. **Int J Clin Pract** 2007; 61:315-9.

Höglund PJ, Nordström KJ, Schiöth HB, Fredriksson R. The solute carrier families have a remarkably long evolutionary history with the majority of the human families present before divergence of Bilaterian species. **Mol Biol Evol** 2011; 28:1531-41.

Hohenester E. Structural insight into Slit-Robo signalling. **Biochem Soc Trans** 2008; 36(Pt 2):251-6.

Hung J, Kishimoto Y, Sugio K, et al. Allele-specific chromosome 3p deletions occur at an early stage in the pathogenesis of lung carcinoma. **JAMA** 1995; 273:1908.

Ijichi N, Shigekawa T, Ikeda K, et al. Association of Double-Positive FOXA1 and FOXP1 Immunoreactivities with Favorable Prognosis of Tamoxifen-Treated Breast Cancer Patients. **Horm Cancer** 2012 Apr 3 [Epub ahead of print].

Jang JH, Cotterchio M, Gallinger S, Knight JA, Daftary D. Family history of hormonal cancers and colorectal cancer risk: a case-control study conducted in Ontario. **Int J Cancer** 2009; 125:918-25.

Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. **CA Cancer J Clin** 2011; 61:69-90.

Jensen UB, Sunde L, Timshel S, et al. Mismatch repair defective breast cancer in the hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome. **Breast Cancer Res Treat** 2010; 120:777-82.

Kaufmann E, Knöchel W. Five years on the wings of fork head. **Mech Dev** 1996; 57:3-20.

Khusial PR, Vadla B, Krishnan H, et al. Src activates Abl to augment Robo1 expression in order to promote tumor cell migration. **Oncotarget** 2010; 1:198-209.

Kilpivaara O, Laiho P, Aaltonen LA, Nevanlinna H. CHEK2 1100delC and colorectal cancer. **J Med Genet** 2003; 40:e110.

Klarskov L, Holck S, Bernstein I, Nilbert M. Hereditary colorectal cancer diagnostics: morphological features of familial colorectal cancer type X versus Lynch syndrome. **J Clin Pathol** 2012; 65:352-6.

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

Koh PK, Kalady M, Skacel M, et al. Familial colorectal cancer type X: polyp burden and cancer risk stratification via a family history score. **ANZ J Surg** 2011; 81:537-42.

Komatsu A, Nagasaki K, Fujimori M, Amano J, Miki Y. Identification of novel deletion polymorphisms in breast cancer. **Int J Oncol** 2008; 33:261-70.

Koon HB, Ippolito GC, Banham AH, Tucker PW. FOXP1: a potential therapeutic target in cancer. **Expert Opin Ther Targets** 2007; 11:955-65.

Krepischi AC, Achatz MI, Santos EM, et al. Germline DNA copy number variation in familial and early-onset breast cancer. **Breast Cancer Res** 2012a; 14:R24.

Krepischi AC, Pearson PL, Rosenberg C. Germline copy number variations and cancer predisposition. **Future Oncol** 2012b; 8:441-50.

Kuiper RP, Ligtenberg MJ, Hoogerbrugge N, Geurts van Kessel A. Germline copy number variation and cancer risk. **Curr Opin Genet Dev** 2010; 20:282-9.

Kwei KA, Kung Y, Salari K, Holcomb IN, Pollack JR. Genomic instability in breast cancer: pathogenesis and clinical implications. **Mol Oncol** 2010; 4:255-66.

Lai E, Prezioso VR, Tao WF, Chen WS, Darnell JE Jr. Hepatocyte nuclear factor 3 alpha belongs to a gene family in mammals that is homologous to the Drosophila homeotic gene fork head. **Genes Dev** 1991; 5:416-27.

Lastella P, Patruno M, Forte G, et al. Identification and surveillance of 19 Lynch syndrome families in southern Italy: report of six novel germline mutations and a common founder mutation. **Fam Cancer** 2011; 10:285-95.

Legg JA, Herbert JM, Clissold P, Bicknell R. Slits and Roundabouts in cancer, tumour angiogenesis and endothelial cell migration. **Angiogenesis** 2008; 11:13-21.

Lin KM, Ternent CA, Adams DR, et al. Colorectal cancer in hereditary breast cancer kindreds. **Dis Colon Rectum** 1999; 42:1041-5.

Lipton L, Thomas HJ, Eeles RA, et al. Apparent Mendelian inheritance of breast and colorectal cancer: chance, genetic heterogeneity or a new gene? **Fam Cancer** 2001; 1:189-95.

Lynch HT, Lanspa SJ, Boman BM, et al. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer--Lynch syndromes I and II. **Gastroenterol Clin North Am** 1988; 17:679-712.

Lynch HT, Lynch JF. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer. **Semin Surg Oncol**. 2000; 18:305-13.

Lynch HT, Boland CR, Gong G, et al. Phenotypic and genotypic heterogeneity in the Lynch syndrome: diagnostic, surveillance and management implications. **Eur J Hum Genet** 2006; 14:390-402.

Lynch HT, Lynch PM, Lanspa SJ, Snyder CL, Lynch JF, Boland CR. Review of the Lynch syndrome: history, molecular genetics, screening, differential diagnosis, and medicolegal ramifications. **Clin Genet** 2009; 76:1-18.

MacDonald DJ. Germline mutations in cancer susceptibility genes: an overview for nurses. **Semin Oncol Nurs** 2011; 27:21-33.

Mackenzie B, Erickson JD. Sodium-coupled neutral amino acid (System N/A) transporters of the SLC38 gene family. **Pflugers Arch** 2004; 447:784-95.

Malumbres M, Barbacid M. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. **Nat Rev Cancer** 2001; 1:222-31.

Meijers-Heijboer H, van den Ouweland A, Klijn J, et al. Low-penetrance susceptibility to breast cancer due to CHEK2(\*)1100delC in noncarriers of BRCA1 or BRCA2 mutations. **Nat Genet** 2002; 31:55-9.

Meijers-Heijboer H, Wijnen J, Vasen H, et al. The CHEK2 1100delC mutation identifies families with a hereditary breast and colorectal cancer phenotype. **Am J Hum Genet** 2003; 72:1308-14.

Meyerson M, Enders GH, Wu CL, et al. A family of human cdc2-related protein kinases. **EMBO J** 1992; 11:2909-17.

Mills RE, Walter K, Stewart C, et al. Mapping copy number variation by population-scale genome sequencing. **Nature** 2011; 470:59-65.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa/2012 Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2012.

Mirzaei H, Syed S, Kennedy J, Schmidt KH. Sgs1 truncations induce genome rearrangements but suppress detrimental effects of BLM overexpression in *Saccharomyces cerevisiae*. **J Mol Biol** 2011; 405:877-91.

Monteiro Santos EM, Valentin MD, Carneiro F, et al. Predictive models for mutations in mismatch repair genes: implication for genetic counseling in developing countries. **BMC Cancer** 2012 Feb 9;12:64.

Müller A, Edmonston TB, Corao DA, et al. Exclusion of breast cancer as an integral tumor of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. **Cancer Res** 2002; 62:1014-9.

Muraoka M, Konishi M, Kikuchi-Yanoshita R, et al. p300 gene alterations in colorectal and gastric carcinomas. **Oncogene** 1996; 12:1565-9.

Nagy R, Sweet K, Eng C. Highly penetrant hereditary cancer syndromes. **Oncogene** 2004; 23:6445-70.

Narayan G, Goparaju C, Arias-Pulido H, et al. Promoter hypermethylation-mediated inactivation of multiple Slit-Robo pathway genes in cervical cancer progression. **Mol Cancer** 2006; 5:16.

Naseem H, Boylan J, Speake D, et al. Inherited association of breast and colorectal cancer: limited role of CHEK2 compared with high-penetrance genes. **Clin Genet** 2006; 70:388-95.

Nilbert M, Wikman FP, Hansen TV, et al. Major contribution from recurrent alterations and MSH6 mutations in the Danish Lynch syndrome population. **Fam Cancer** 2009; 8:75-83.

Nishiyama T, Takahashi K, Tango T, et al. A scan statistic to extract causal gene clusters from case-control genome-wide rare CNV data. **BMC Bioinformatics** 2011; 12:205.

Nordgard SH, Johansen FE, Alnaes GI, et al. Genome-wide analysis identifies 16q deletion associated with survival, molecular subtypes, mRNA expression, and germline haplotypes in breast cancer patients. **Genes Chromosomes Cancer** 2008; 47:680-96.

Oliveira Ferreira F, Napoli Ferreira CC, Rossi BM, et al. Frequency of extra-colonic tumors in hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC) and familial colorectal cancer (FCC) Brazilian families: an analysis by a Brazilian Hereditary Colorectal Cancer Institutional Registry. **Fam Cancer** 2004; 3:41-7.

Olsen JH, Seersholm N, Boice JD Jr, Krüger Kjaer S, Fraumeni JF Jr. Cancer risk in close relatives of women with early-onset breast cancer - a population-based incidence study. **Br J Cancer** 1999; 79:673-9.

Ortiz P, Vanaclocha F, López-Bran E, et al. Genetic analysis of the GRM1 gene in human melanoma susceptibility. **Eur J Hum Genet** 2007; 15:1176-82.

Ostrovnaya I, Nanjangud G, Olshen AB. A classification model for distinguishing copy number variants from cancer-related alterations. **BMC Bioinformatics** 2010; 11:297.

Peltomäki P, Vasen HF. Mutations predisposing to hereditary nonpolyposis colorectal cancer: database and results of a collaborative study. The International Collaborative Group on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. **Gastroenterology** 1997; 113:1146-58.

Pesole G, Grillo G, Larizza A, Liuni S. The untranslated regions of eukaryotic mRNAs: structure, function, evolution and bioinformatic tools for their analysis. **Brief Bioinform** 2000; 1:236-49.

Peters GN, Fodera T, Sabol J, Jones S, Euhus D. Estrogen replacement therapy after breast cancer: a 12-year follow-up. **Ann Surg Oncol** 2001; 8:828-32.

Pin JP, Duvoisin R. The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. **Neuropharmacology** 1995; 34:1-26.

Pollock PM, Cohen-Solal K, Sood R, et al. Melanoma mouse model implicates metabotropic glutamate signaling in melanocytic neoplasia. **Nat Genet** 2003; 34:108-12.

Rayoo M, Yan M, Takano EA, Bates GJ, et al. Expression of the forkhead box transcription factor FOXP1 is associated with oestrogen receptor alpha, oestrogen receptor beta and improved survival in familial breast cancers. **J Clin Pathol** 2009; 62:896-902.

Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, et al. Global variation in copy number in the human genome. **Nature** 2006; 444:444-54.

Reedijk M, Odorcic S, Zhang H, et al. Activation of Notch signaling in human colon adenocarcinoma. **Int J Oncol** 2008; 33:1223-9.

Ren S, Rollins BJ. Cyclin C/cdk3 promotes Rb-dependent G0 exit. **Cell** 2004; 117:239-51.

Risinger JI, Barrett JC, Watson P, Lynch HT, Boyd J. Molecular genetic evidence of the occurrence of breast cancer as an integral tumor in patients with the hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma syndrome. **Cancer** 1996; 77:1836-43.

Robson M, Gilewski T, Haas B, et al. BRCA-associated breast cancer in young women. **J Clin Oncol** 1998; 16:1642-9.

Rush LJ, Raval A, Funchain P, et al. Epigenetic profiling in chronic lymphocytic leukemia reveals novel methylation targets. **Cancer Res** 2004; 64:2424-33.

Sawasaki T, Shigemasa K, Gu L, Beard JB, O'Brien TJ. The transmembrane protease serine (TMPRSS3/TADG-12) D variant: a potential candidate for diagnosis and therapeutic intervention in ovarian cancer. **Tumour Biol** 2004; 25:141-8.

Schang LM, Bantly A, Schaffer PA. Explant-induced reactivation of herpes simplex virus occurs in neurons expressing nuclear cdk2 and cdk4. **J Virol** 2002; 76:7724-35.

Schutte M, Seal S, Barfoot R, et al. Variants in CHEK2 other than 1100delC do not make a major contribution to breast cancer susceptibility. **Am J Hum Genet** 2003; 72:1023-8.

Scott KL, Plon SE. CHES1/FOXN3 interacts with Ski-interacting protein and acts as a transcriptional repressor. **Gene** 2005; 359:119-26.

Selamat SA, Galler JS, Joshi AD, et al. DNA methylation changes in atypical adenomatous hyperplasia, adenocarcinoma in situ, and lung adenocarcinoma. **PLoS One** 2011; 6:e21443.

Shelling AN, Ferguson LR. Genetic variation in human disease and a new role for copy number variants. **Mutat Res** 2007; 622:33-41.

Shen F, Liu X, Geng JG, Guo SW. Increased immunoreactivity to SLIT/ROBO1 in ovarian endometriomas: a likely constituent biomarker for recurrence. **Am J Pathol** 2009; 175:479-88.

Shigekawa T, Ijichi N, Ikeda K, et al. FOXP1, an estrogen-inducible transcription factor, modulates cell proliferation in breast cancer cells and 5-year recurrence-free survival of patients with tamoxifen-treated breast cancer. **Horm Cancer** 2011; 2:286-97.

Shlien A, Tabori U, Marshall CR, et al. Excessive genomic DNA copy number variation in the Li-Fraumeni cancer predisposition syndrome. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2008; 105:11264-9.

Shlien A, Malkin D. Copy number variations and cancer. **Genome Med** 2009; 1:62.

Shlien A, Malkin D. Copy number variations and cancer susceptibility. **Curr Opin Oncol** 2010; 22:55-63.

Shulman LP. Hereditary breast and ovarian cancer (HBOC): clinical features and counseling for BRCA1 and BRCA2, Lynch syndrome, Cowden syndrome, and Li-Fraumeni syndrome. **Obstet Gynecol Clin North Am** 2010; 37:109-33.

Solomou EE, Sfikakis PP, Kotsi P, et al. 13q deletion in chronic lymphocytic leukemia: characterization of E4.5, a novel chromosome condensation regulator-like guanine nucleotide exchange factor. **Leuk Lymphoma** 2003; 44:1579-85.

Speyer CL, Smith JS, Banda M, DeVries JA, Mekani T, Gorski DH. Metabotropic glutamate receptor-1: a potential therapeutic target for the treatment of breast cancer. **Breast Cancer Res Treat** 2012; 132:565-73.

Stankiewicz P, Lupski JR. Structural variation in the human genome and its role in disease. **Annu Rev Med** 2010; 61:437-55.

Sundaresan V, Chung G, Heppell-Parton A, et al. Homozygous deletions at 3p12 in breast and lung cancer. **Oncogene** 1998; 17:1723-9.

Sundberg BE, Wååg E, Jacobsson JA, et al. The evolutionary history and tissue mapping of amino acid transporters belonging to solute carrier families SLC32, SLC36, and SLC38. **J Mol Neurosci** 2008; 35:179-93.

Thacker J. The RAD51 gene family, genetic instability and cancer. **Cancer Lett** 2005; 219:125-35.

Thean LF, Loi C, Ho KS, Koh PK, Eu KW, Cheah PY. Genome-wide scan identifies a copy number variable region at 3q26 that regulates PPM1L in APC mutation-negative familial colorectal cancer patients. **Genes Chromosomes Cancer** 2010; 49:99-106.

Theile M, Seitz S, Arnold W, et al. A defined chromosome 6q fragment (at D6S310) harbors a putative tumor suppressor gene for breast cancer. **Oncogene** 1996; 13:677-85.

Thélu J, Rossio P, Favier B. Notch signalling is linked to epidermal cell differentiation level in basal cell carcinoma, psoriasis and wound healing. **BMC Dermatol** 2002; 2:7.

Thompson D, Easton D. Breast Cancer Linkage Consortium. Variation in BRCA1 cancer risks by mutation position. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2002; 11:329-36.

Thompson D, Easton D. The genetic epidemiology of breast cancer genes. **J Mammary Gland Biol Neoplasia** 2004; 9:221-36.

Turley H, Wu L, Canamero M, Gatter KC, Hickson ID. The distribution and expression of the Bloom's syndrome gene product in normal and neoplastic human cells. **Br J Cancer** 2001; 85:261-5.

Ueno T, Emi M, Sato H, et al. Genome-wide copy number analysis in primary breast cancer. **Expert Opin Ther Targets** 2012; 16 Suppl 1:S31-5.

Umar A, Boland CR, Terdiman JP, et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. **J Natl Cancer Inst** 2004; 96:261-8.

Urban TJ, Sebro R, Hurowitz EH, et al. Functional genomics of membrane transporters in human populations. **Genome Res** 2006; 16:223-30.

Vahteristo P, Bartkova J, Eerola H, et al. A CHEK2 genetic variant contributing to a substantial fraction of familial breast cancer. **Am J Hum Genet** 2002; 71:432-8.

Valentin MD, da Silva FC, dos Santos EM, et al. Characterization of germline mutations of MLH1 and MSH2 in unrelated south American suspected Lynch syndrome individuals. **Fam Cancer** 2011; 10:641-7.

Vasen HF, Mecklin JP, Khan PM, Lynch HT. The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). **Dis Colon Rectum** 1991; 34:424-5.

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

Vasen HF, Stormorken A, Menko FH, et al. MSH2 mutation carriers are at higher risk of cancer than MLH1 mutation carriers: a study of hereditary nonpolyposis colorectal cancer families. **J Clin Oncol** 2001; 19:4074-80.

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

Venkatachalam R, Verwiel ET, Kamping EJ, et al. Identification of candidate predisposing copy number variants in familial and early-onset colorectal cancer patients. **Int J Cancer** 2011; 129:1635-42.

Venkitaraman AR. Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. **Cell** 2002; 108:171-82.

Wallrapp C, Hähnel S, Müller-Pillasch F, et al. A novel transmembrane serine protease (TMPRSS3) overexpressed in pancreatic cancer. **Cancer Res** 2000; 60:2602-6.

Walsh CS, Ogawa S, Scoles DR, et al. Genome-wide loss of heterozygosity and uniparental disomy in BRCA1/2-associated ovarian carcinomas. **Clin Cancer Res** 2008; 14:7645-51.

Wang J, Luo MH, Zhang ZX, et al. Clinical and molecular analysis of hereditary non-polyposis colorectal cancer in Chinese colorectal cancer patients. **World J Gastroenterol** 2007; 13:1612-7.

Wang J, Wang L, Liu FF, et al. Robo1 expression in breast cancer and its relationship to brain metastasis (abstract). **Zhonghua Zhong Liu Za Zhi** 2011; 33:447-51.

Watson P, Lynch HT. The tumor spectrum in HNPCC. **Anticancer Res** 1994; 14:1635-9.

Wattenhofer M, Shibuya K, Kudoh J, et al. Isolation and characterization of the UBASH3A gene on 21q22.3 encoding a potential nuclear protein with a novel combination of domains. **Hum Genet** 2001; 108:140-7.

Willet KE, McMenamin P, Pinkerton KE, et al. Lung morphometry and collagen and elastin content: changes during normal development and after prenatal hormone exposure in sheep. **Pediatr Res** 1999; 45:615-25.

Xian J, Clark KJ, Fordham R, Pannell R, Rabbitts TH, Rabbitts PH. Inadequate lung development and bronchial hyperplasia in mice with a targeted deletion in the Dutt1/Robo1 gene. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2001; 98:15062-6.

Xian J, Aitchison A, Bobrow L, et al. Targeted disruption of the 3p12 gene, Dutt1/Robo1, predisposes mice to lung adenocarcinomas and lymphomas with methylation of the gene promoter. **Cancer Res** 2004; 64:6432-7.

Xu Y, Peng B, Fu Y, Amos CI. Genome-wide algorithm for detecting CNV associations with diseases. **BMC Bioinformatics** 2011; 12:331.

Yoshihara K, Tajima A, Adachi S, et al. Germline copy number variations in BRCA1-associated ovarian cancer patients. **Genes Chromosomes Cancer** 2011; 50:167-77.

Yuan B, Xu Y, Woo JH, et al. Increased expression of mitotic checkpoint genes in breast cancer cells with chromosomal instability. **Clin Cancer Res** 2006; 12:405-10.

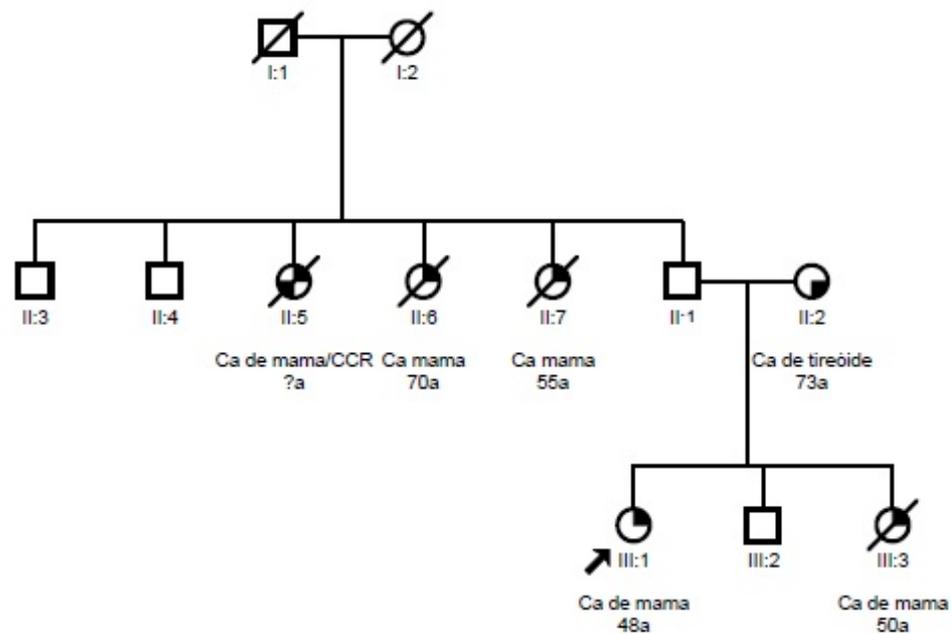
Yuneva M, Zamboni N, Oefner P, Sachidanandam R, Lazebnik Y. Deficiency in glutamine but not glucose induces MYC-dependent apoptosis in human cells. **J Cell Biol** 2007; 178:93-105.

Zheng D, Cho YY, Lau AT, et al. Cyclin-dependent kinase 3-mediated activating transcription factor 1 phosphorylation enhances cell transformation. **Cancer Res** 2008; 68:7650-60.

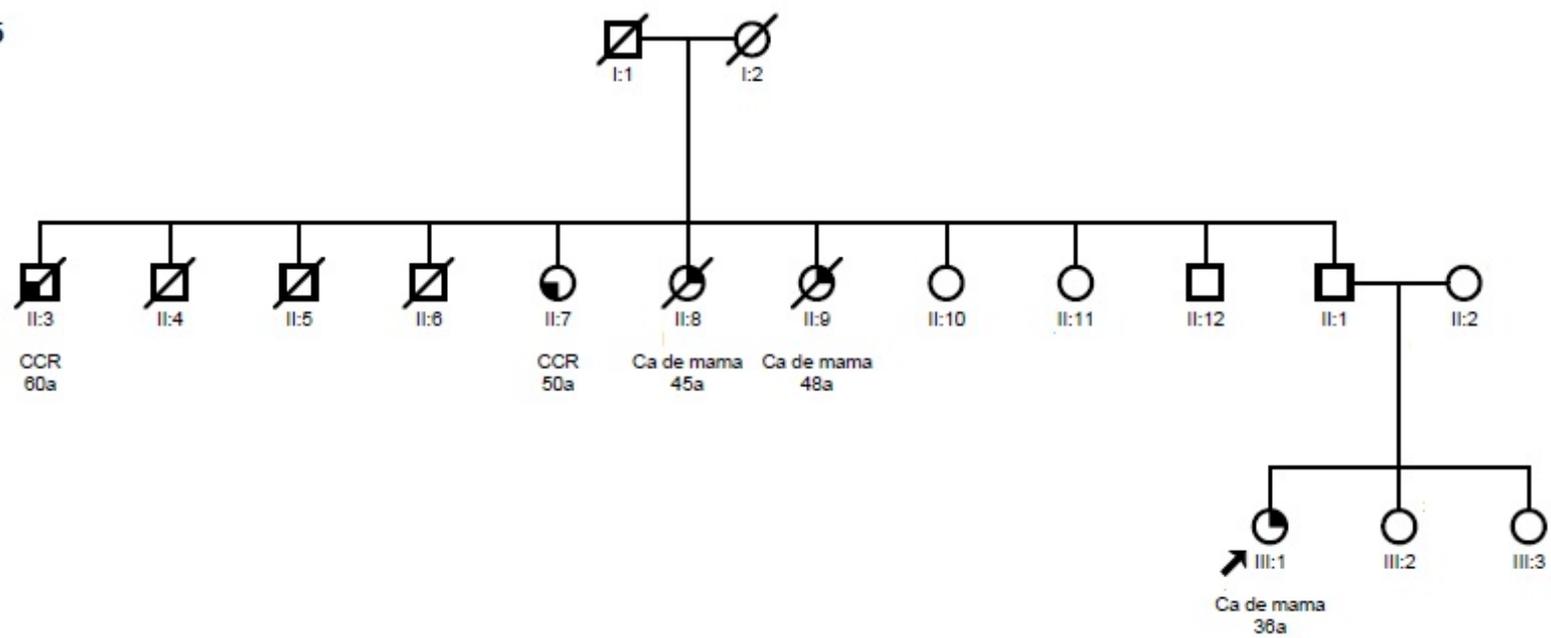
Zhou X, Münger K. Cld7, a candidate tumor suppressor on chromosome 13q14, regulates pathways of DNA damage/repair and apoptosis. **Cancer Res** 2010; 70:9434-43.

# Anexo 1 - Heredogramas

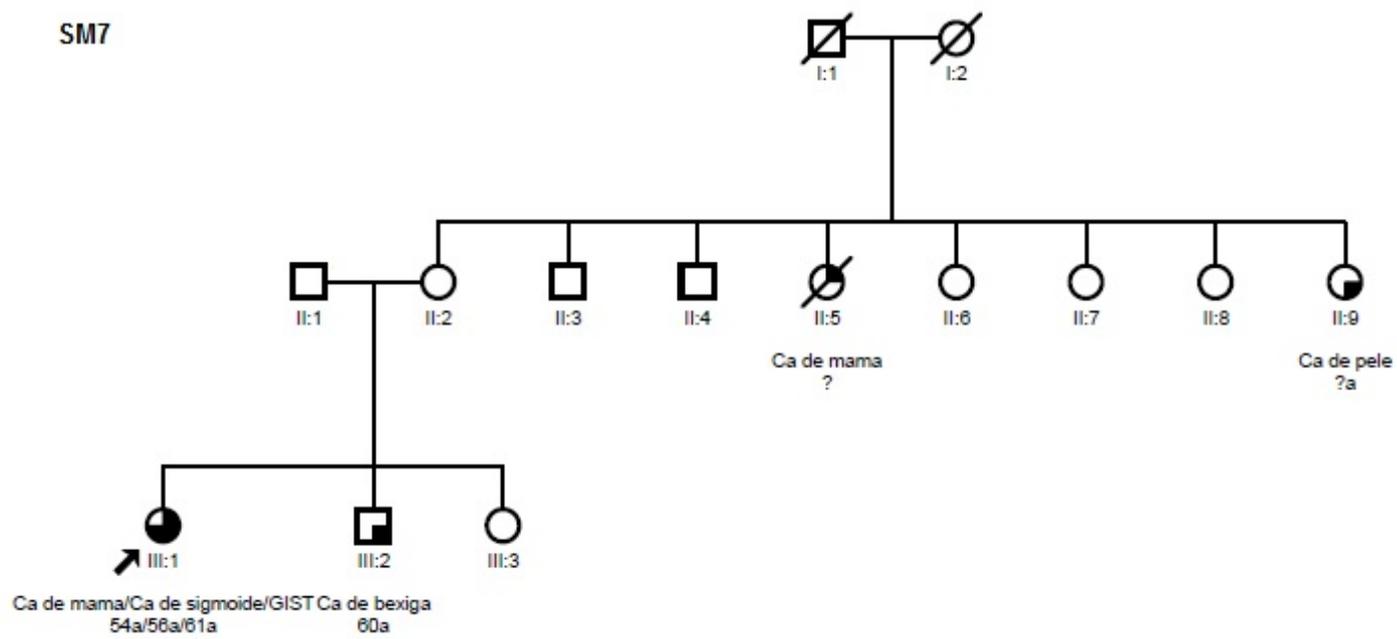
SM4



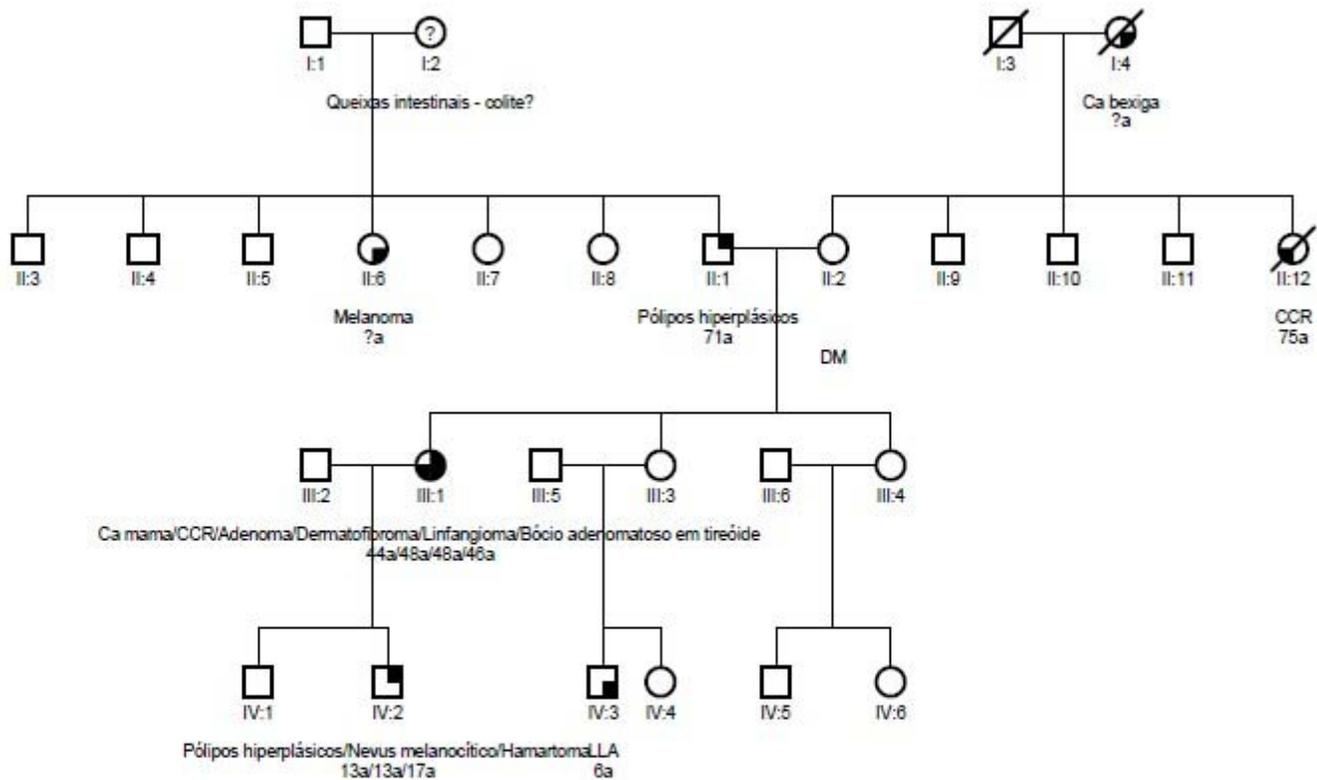
SM5



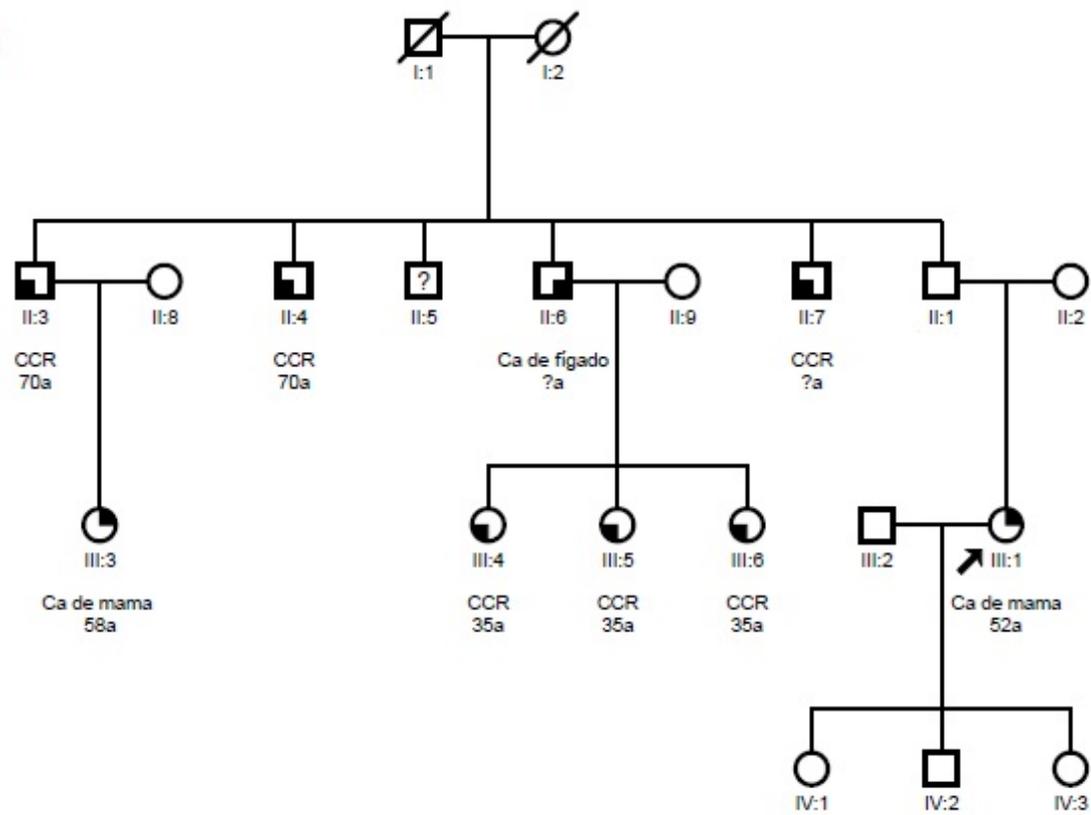
SM7



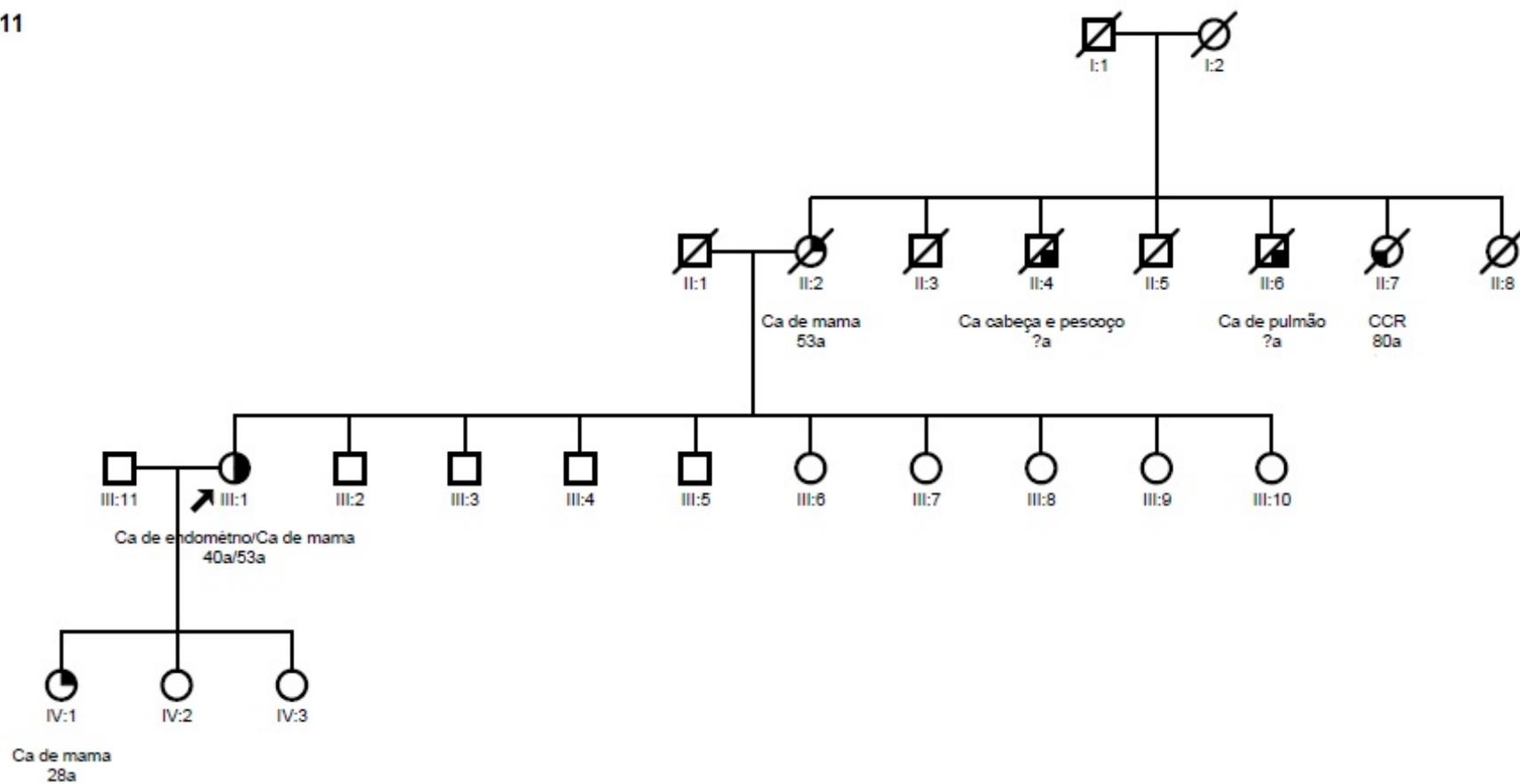
SM9



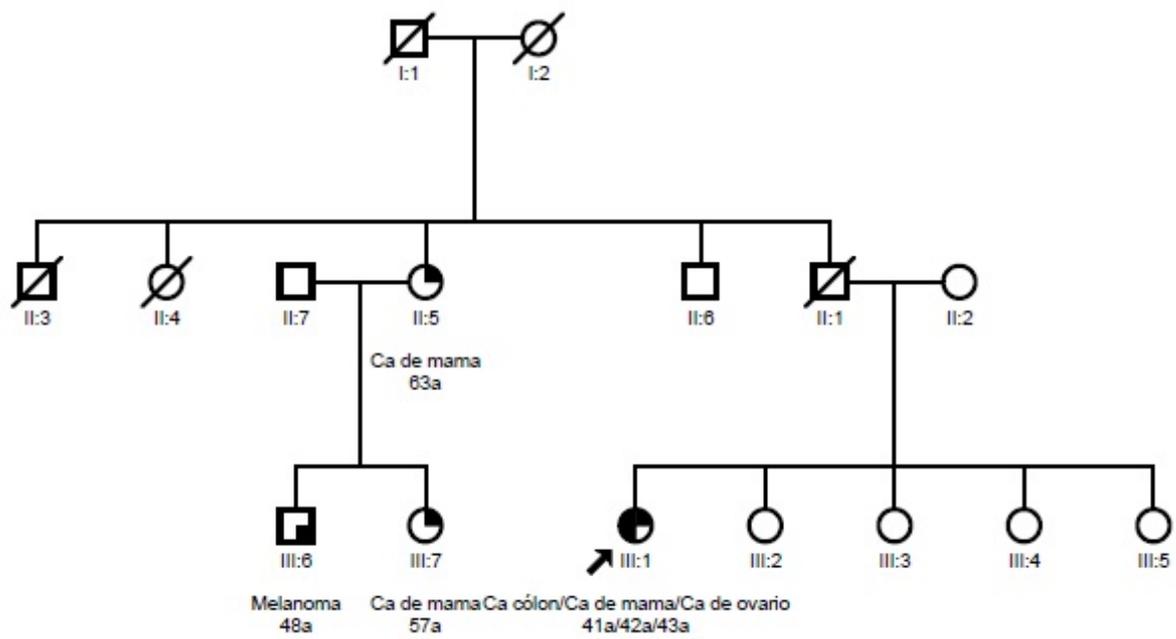
SM10



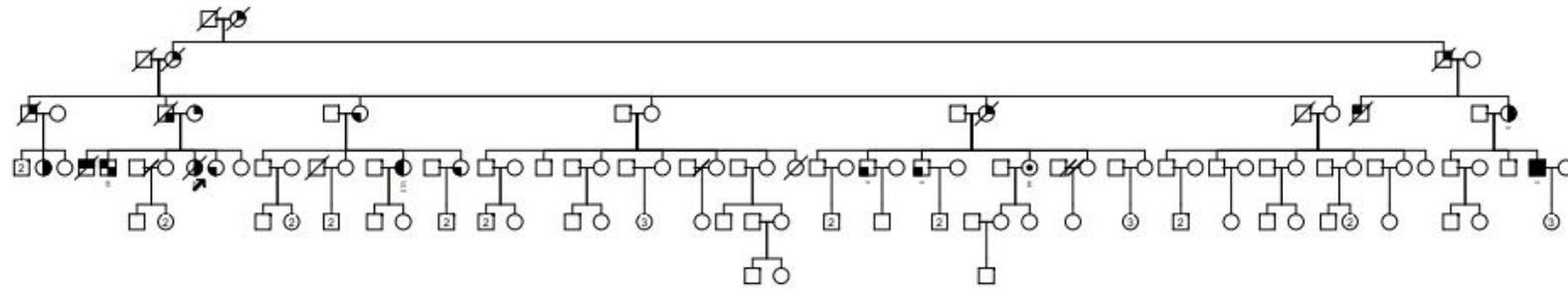
SM11



SM12

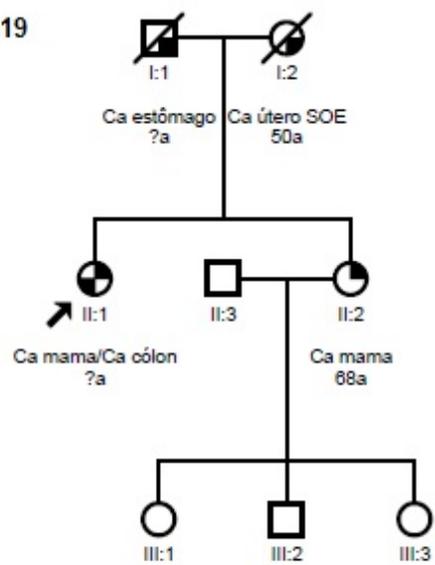


SM14

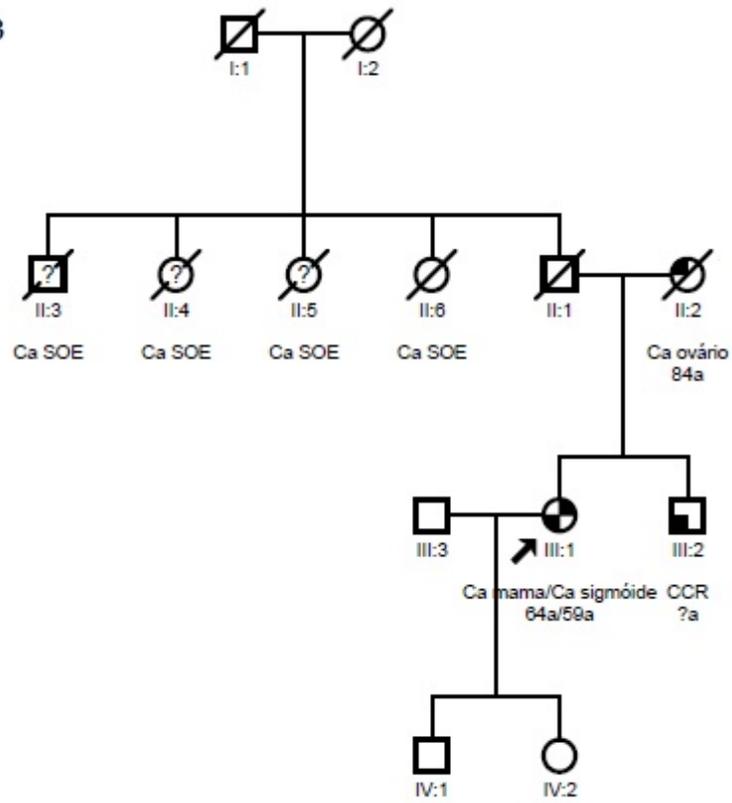


Symbol definitions	
□	○ Clear symbol
■	● Adenoma
◻	◉ Melanoma
◻	◐ Colon
◻	◑ Rectal
◻	◒ Polyposis
◻	◓ Unknown
◻	◔ Polyposis/Colon
◻	◕ Desmoid/Colon
◻	◖ Polyposis/Stomach
◻	◗ Polyposis/Breast/Colon

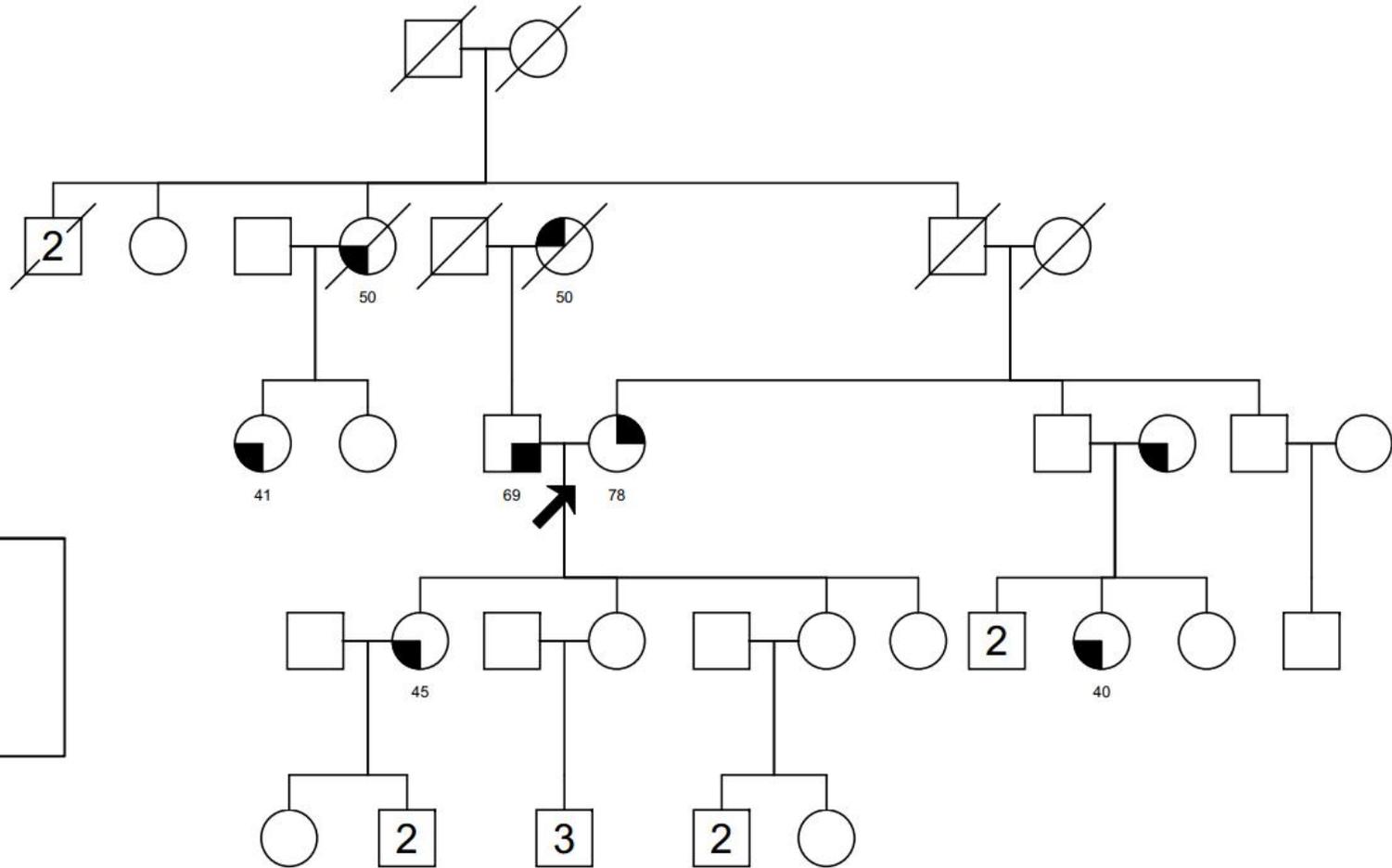
SM19



SM23

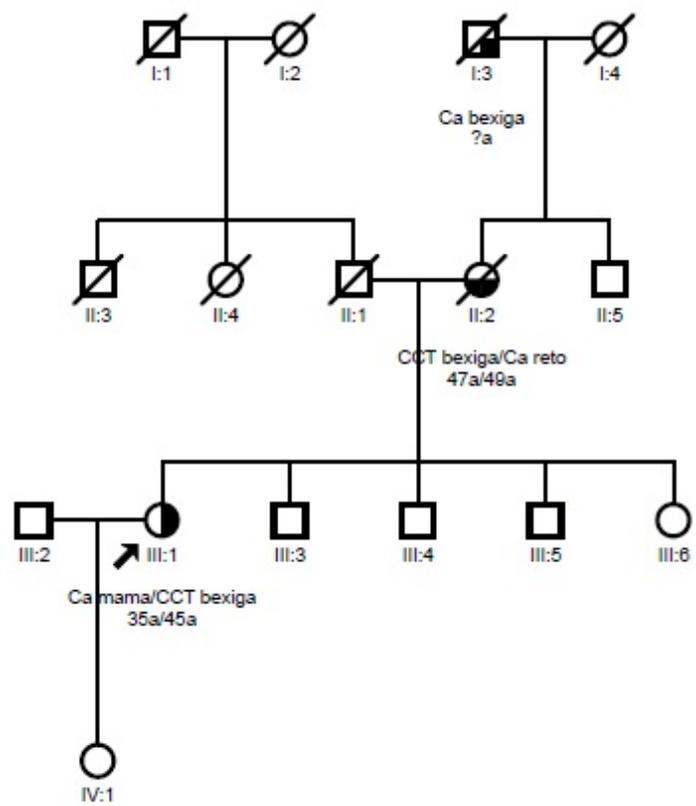


SM26

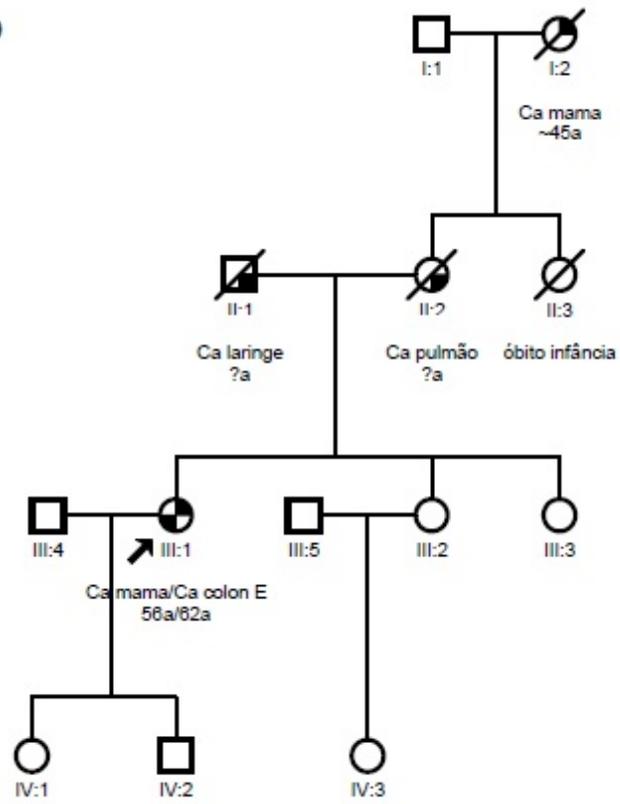


Symbol definitions	
□	○ Clear symbol
▤	◐ Colon
▥	◑ Prostate
▦	◒ Breast
▧	◓ Ovary/Skin

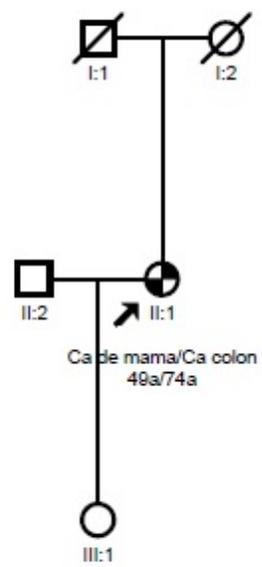
SM28



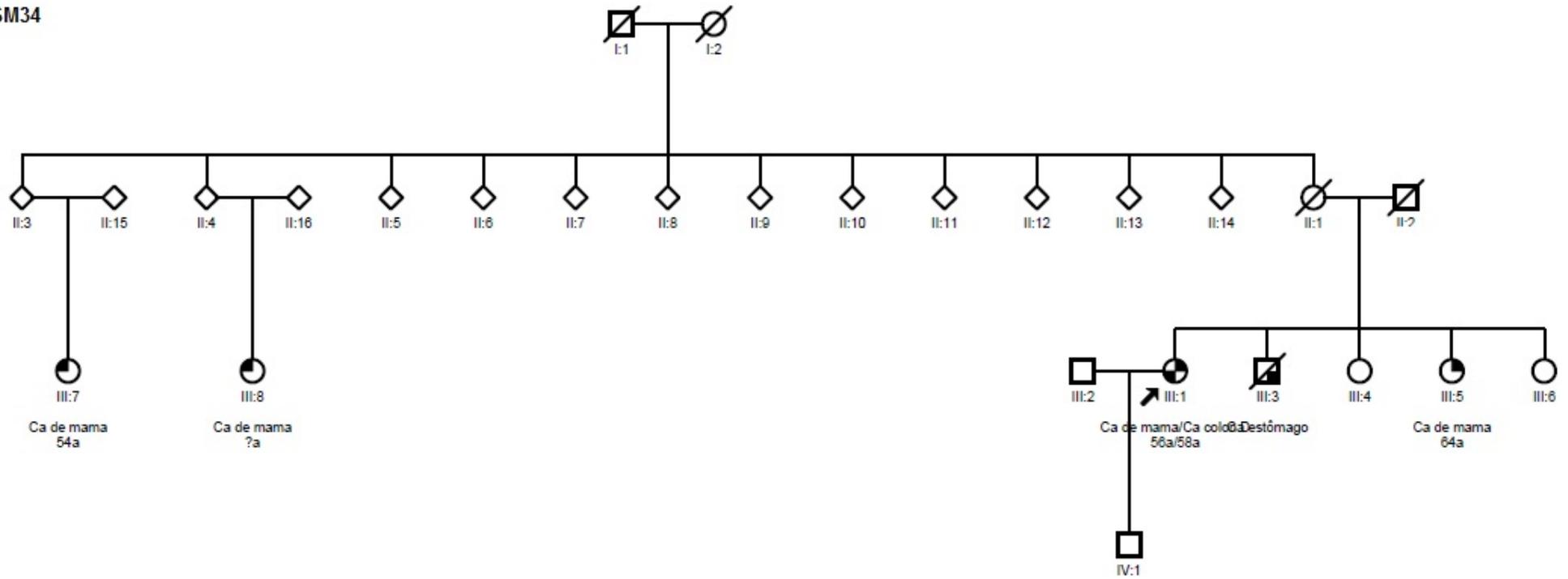
SM30



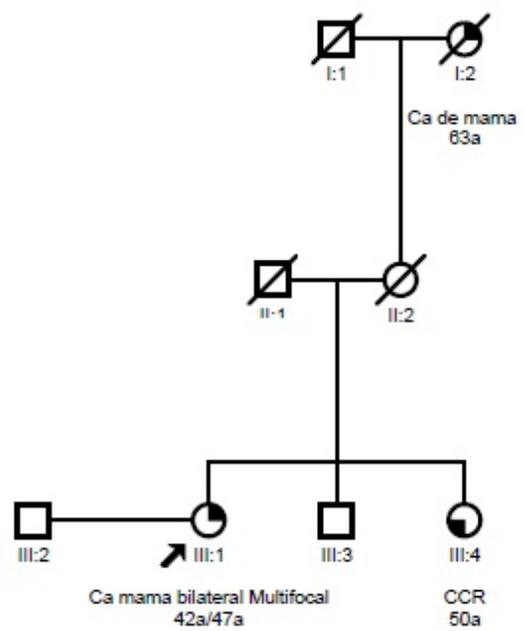
SM33



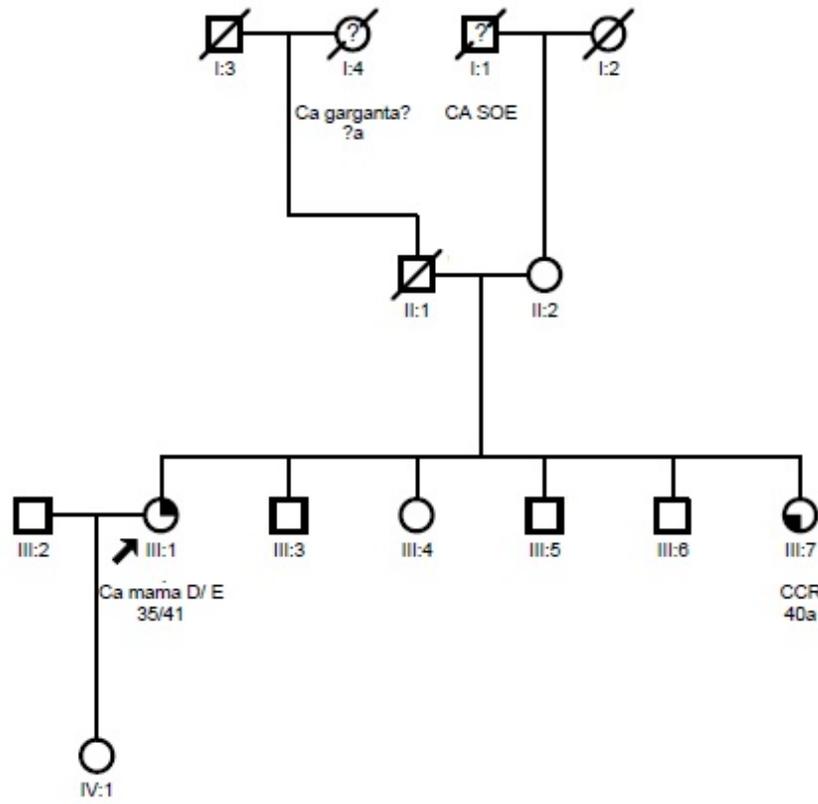
SM34



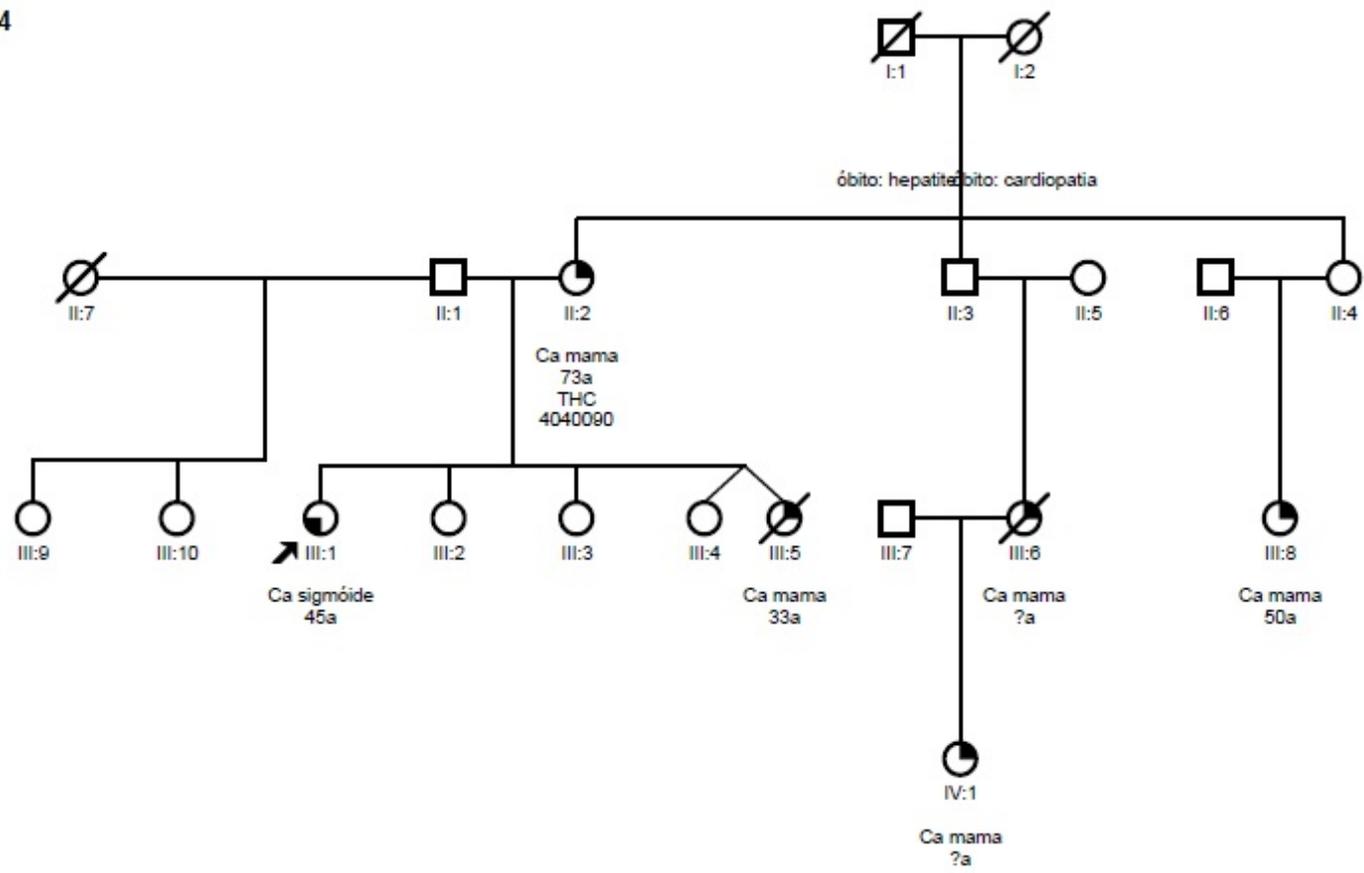
SM38



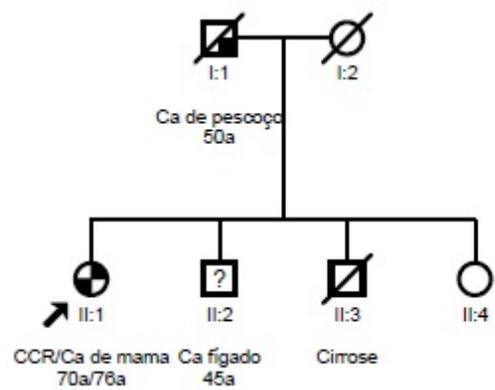
SM41



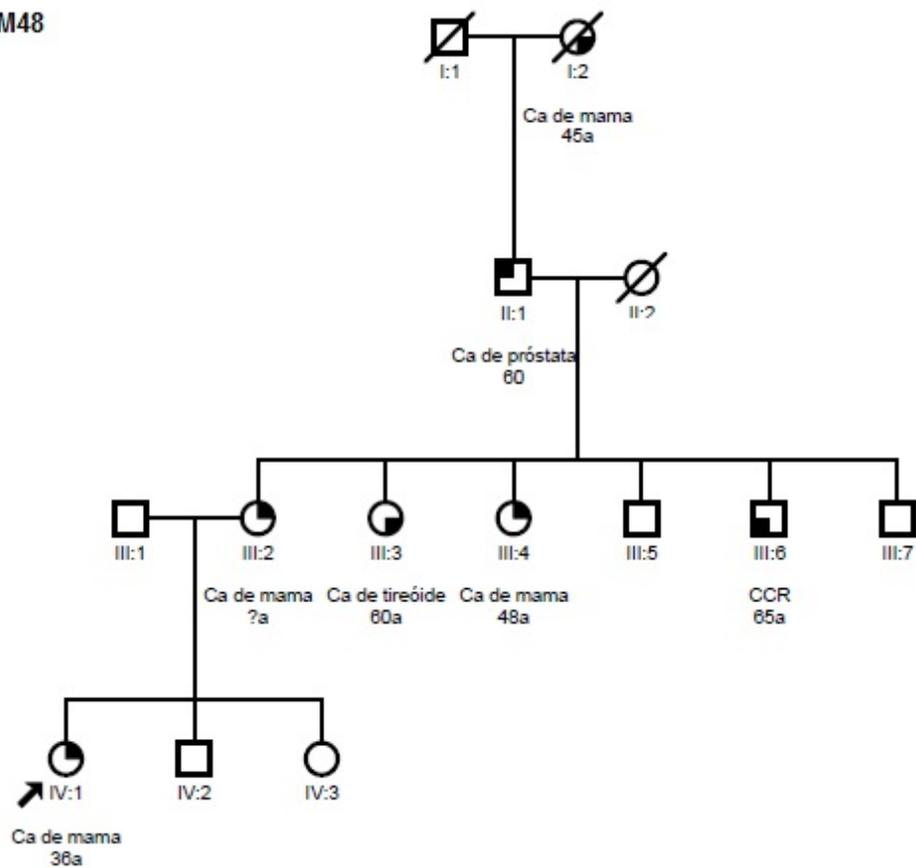
SM44



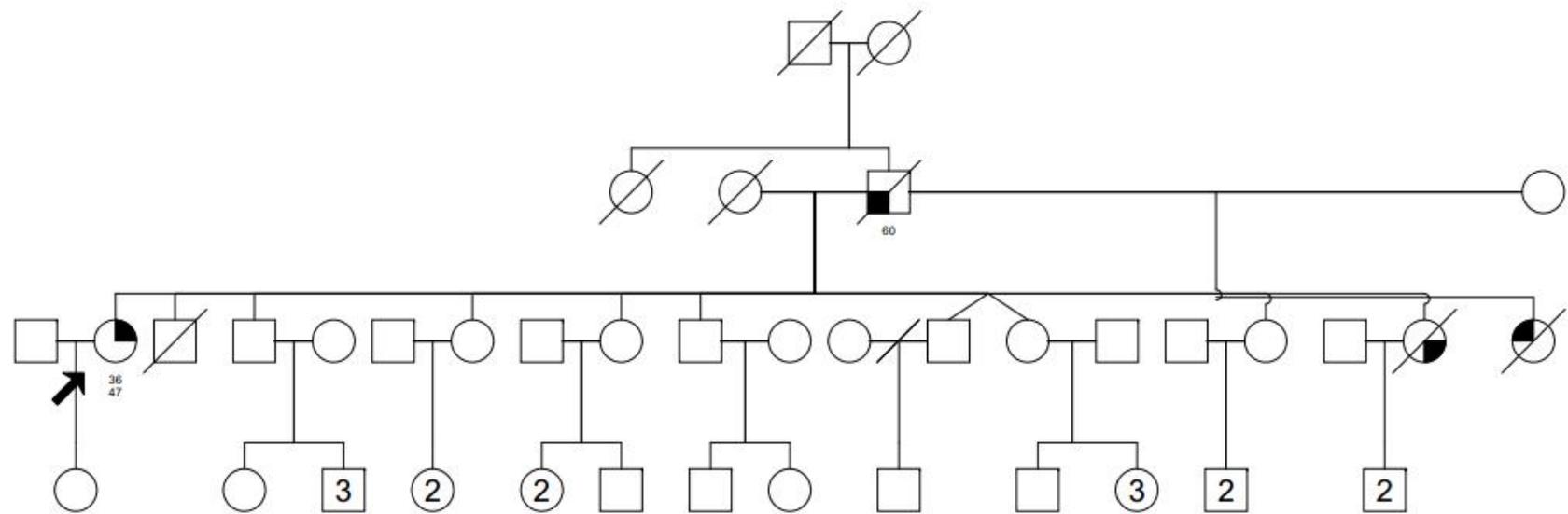
SM47



SM48

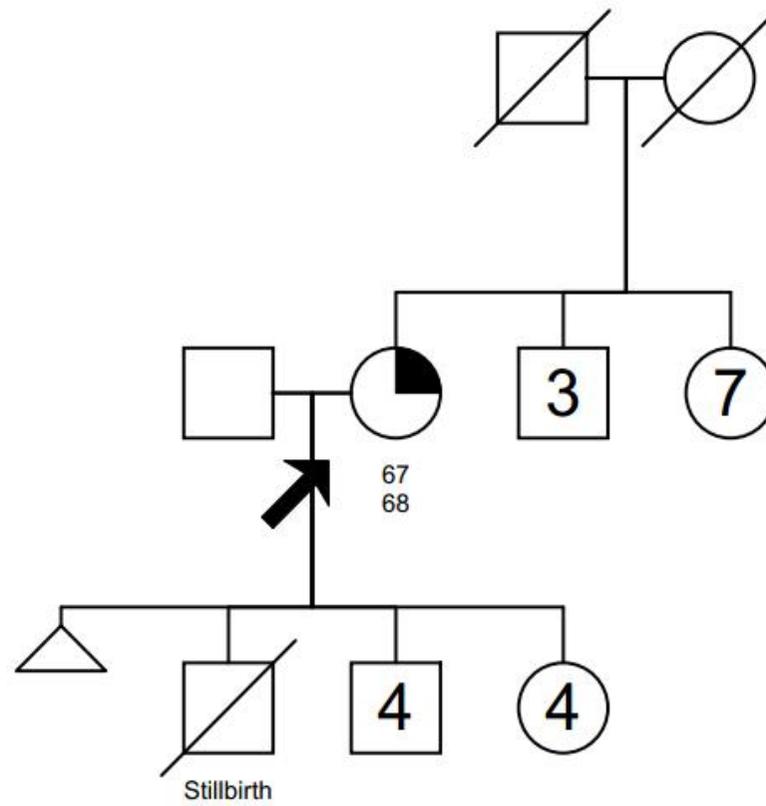


SM150



Symbol definitions	
□	○ Clear symbol
■	● Breast/Rectal
◻	◐ Unknown
◼	◑ Prostate
◽	◒ Breast

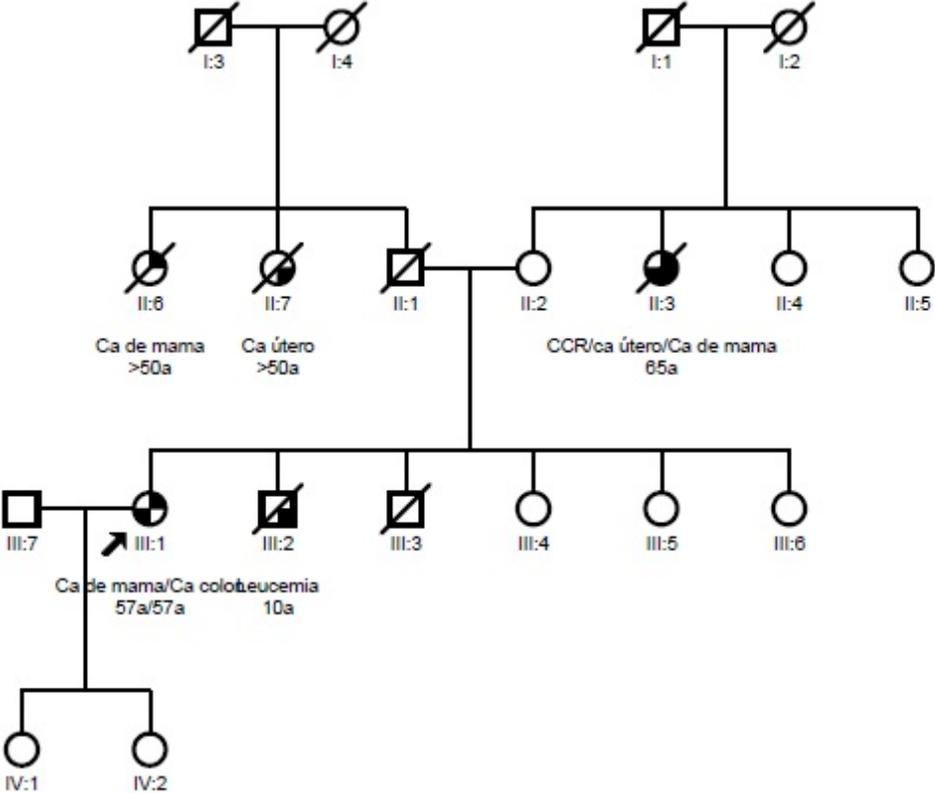
SM57



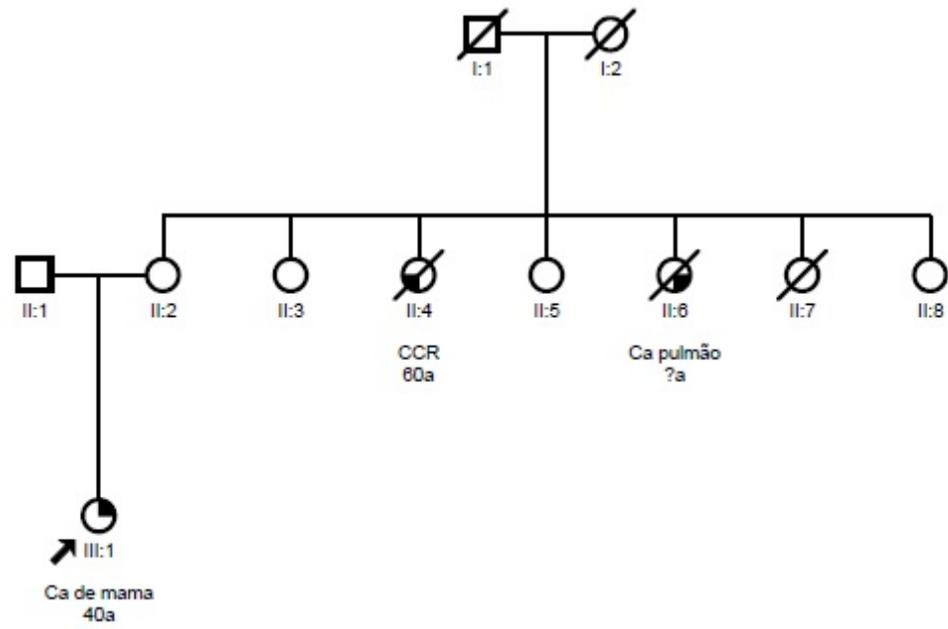
Symbol definitions

□	○	Clear symbol
◼	◐	Breast/Colon
△	△	Spontaneous abortion
male	female	

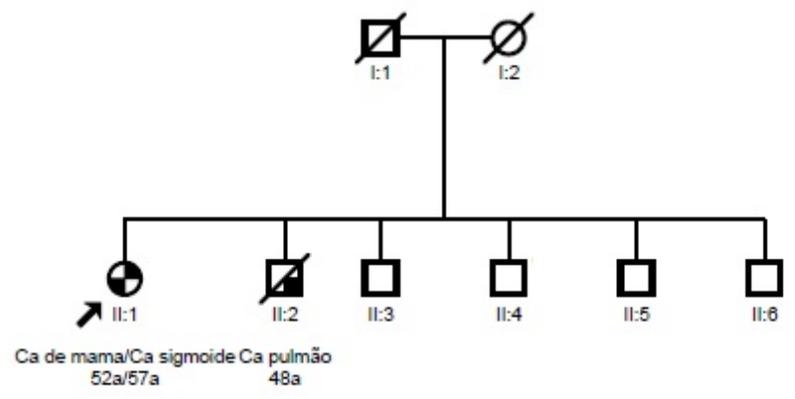
SM59



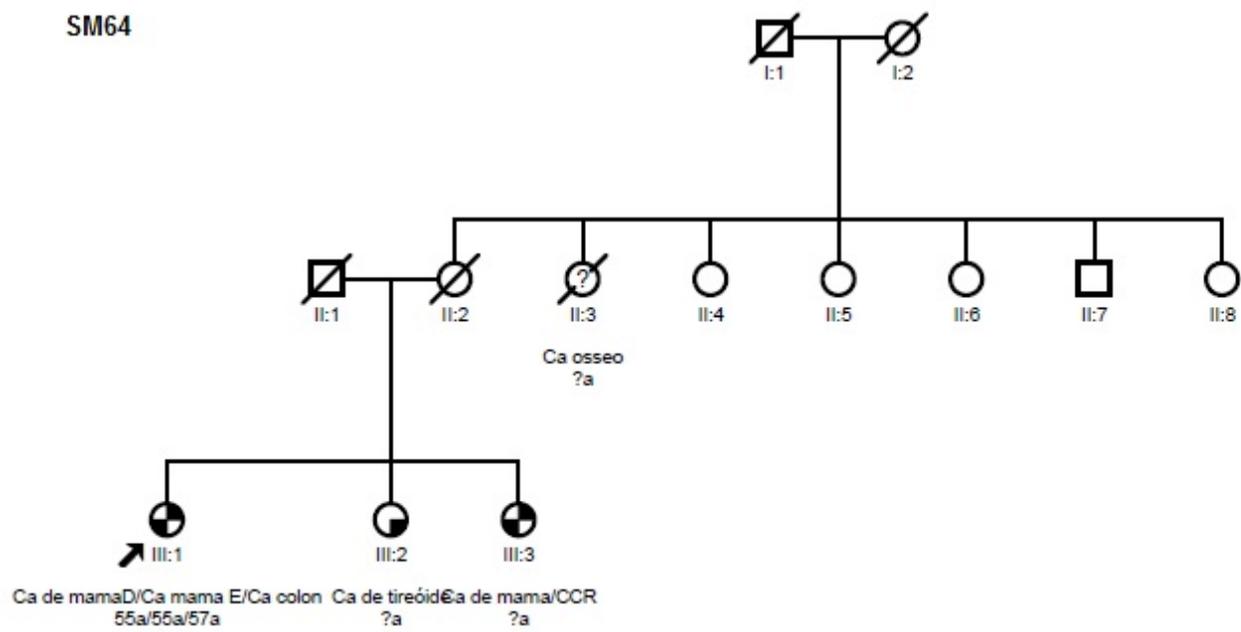
SM60



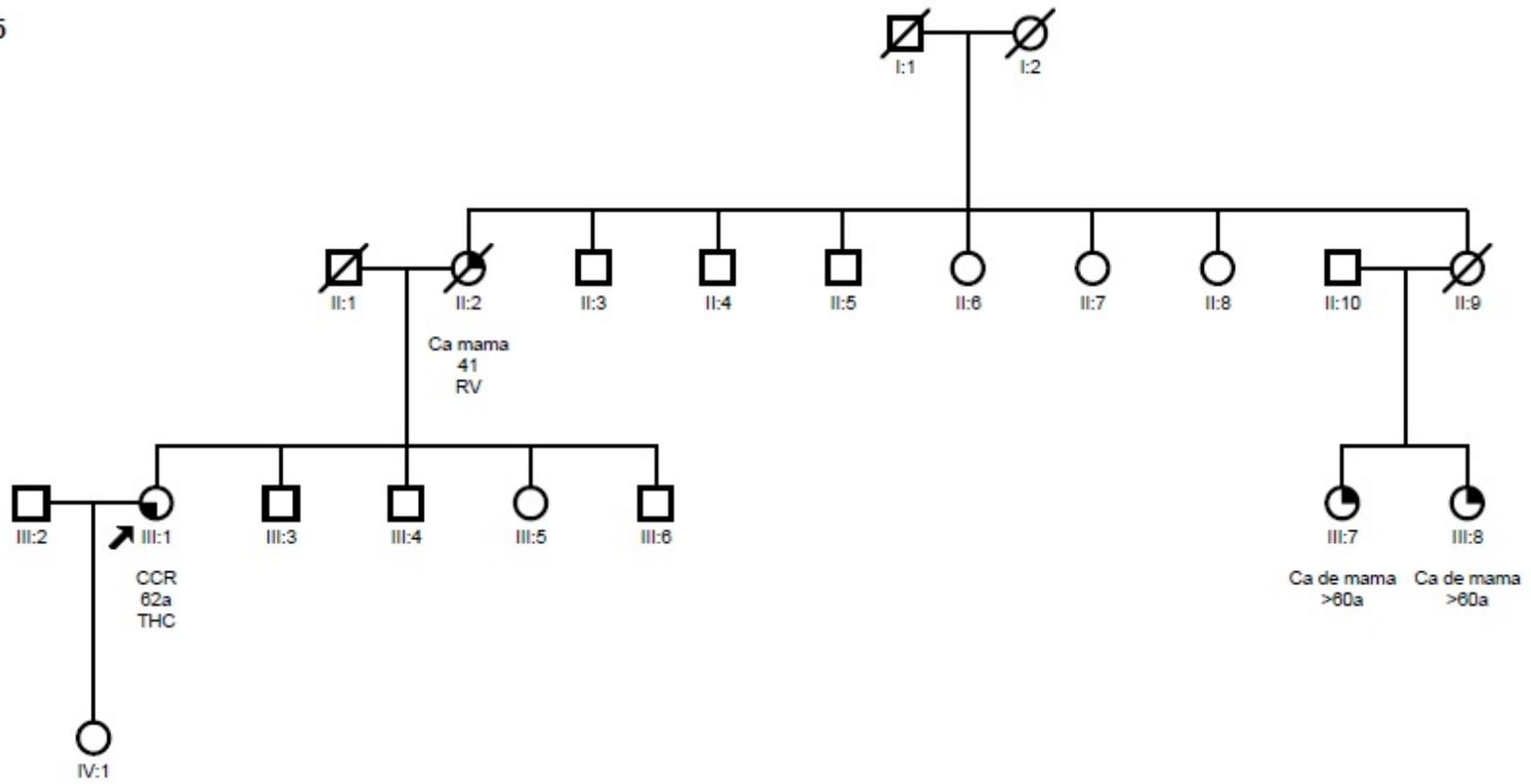
SM63



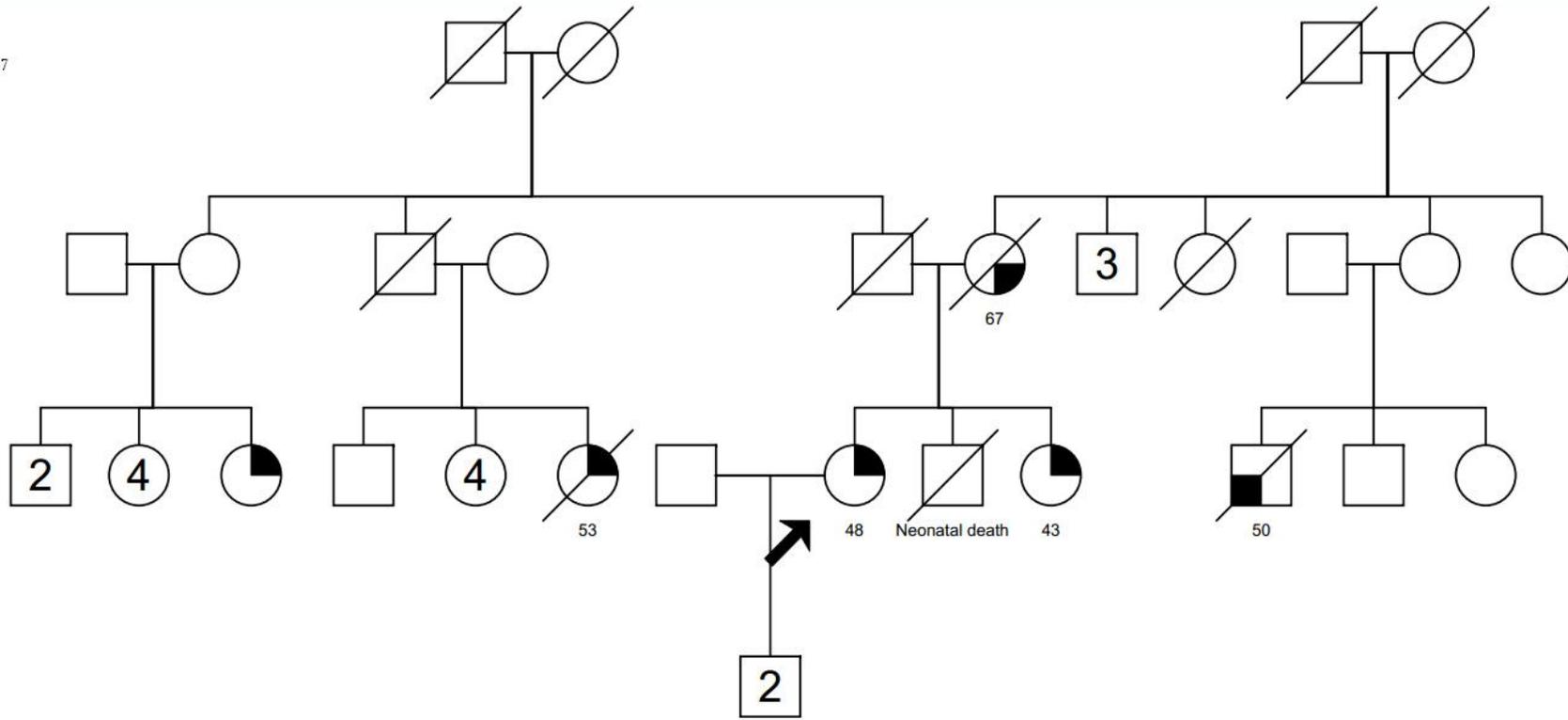
SM64



SM65

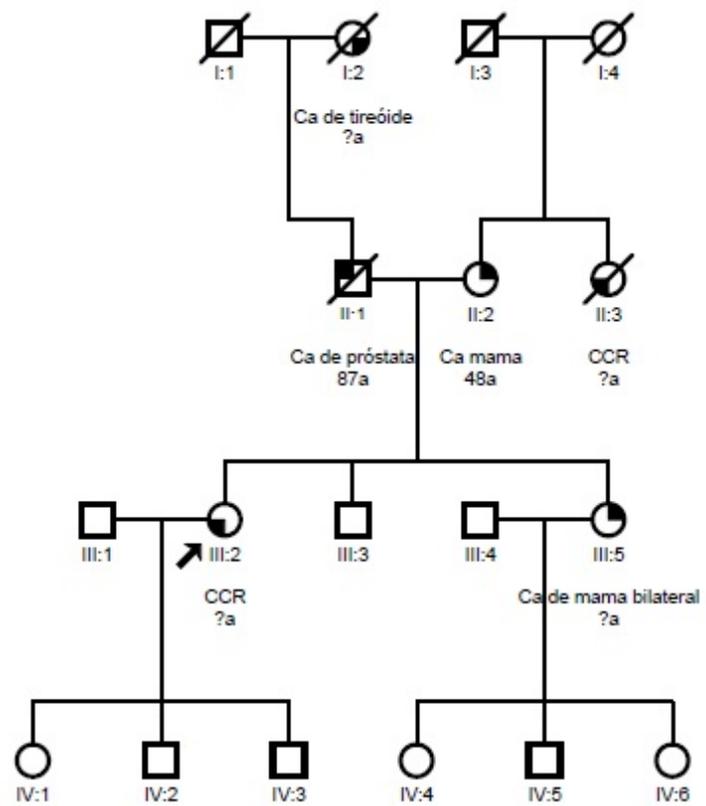


SM67

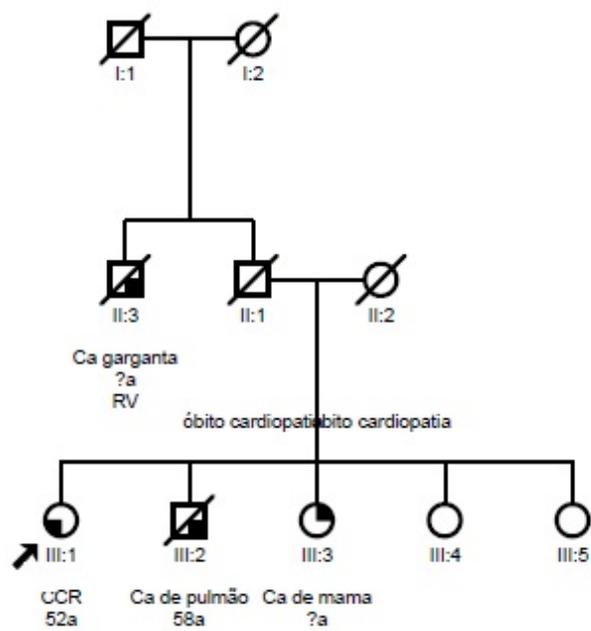


Symbol definitions	
□	○ Clear symbol
■	● Breast
▣	◐ Breast/Pancreatic
◑	○ Colon

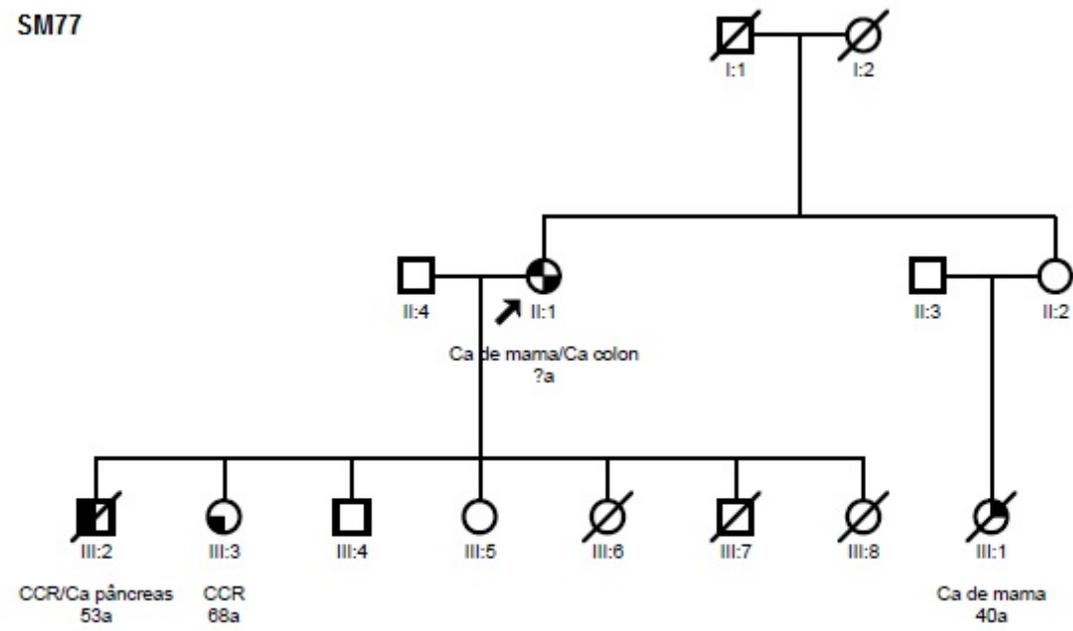
SM70



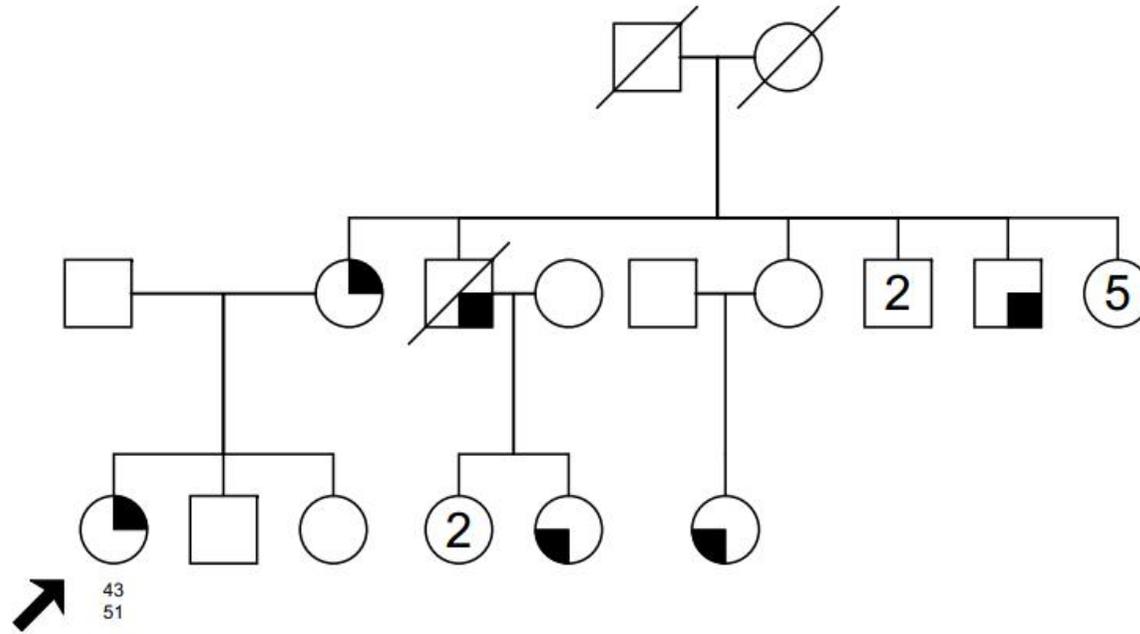
SM71



SM77

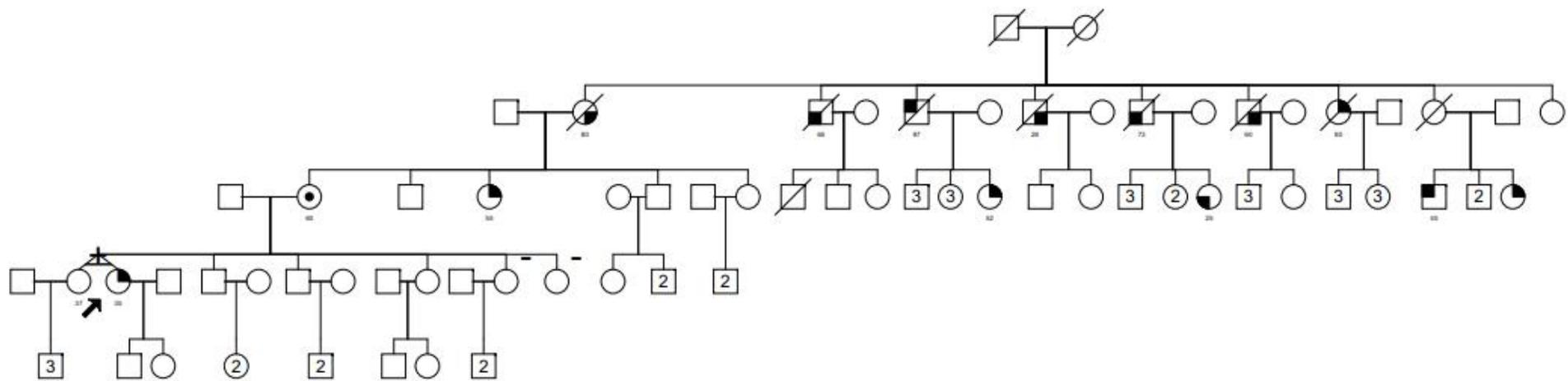


SM178



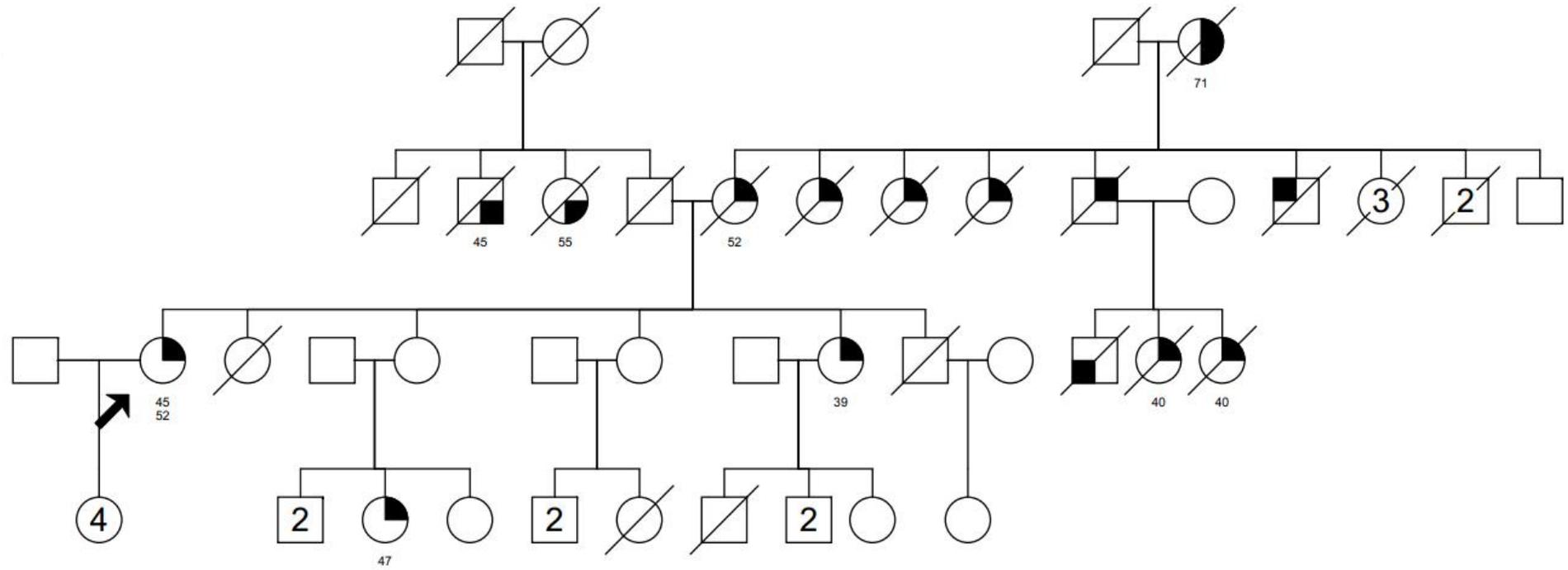
Symbol definitions	
□	○ Clear symbol
◻	◐ Colon
◻	◑ Prostate
◻	◒ Breast

SM83



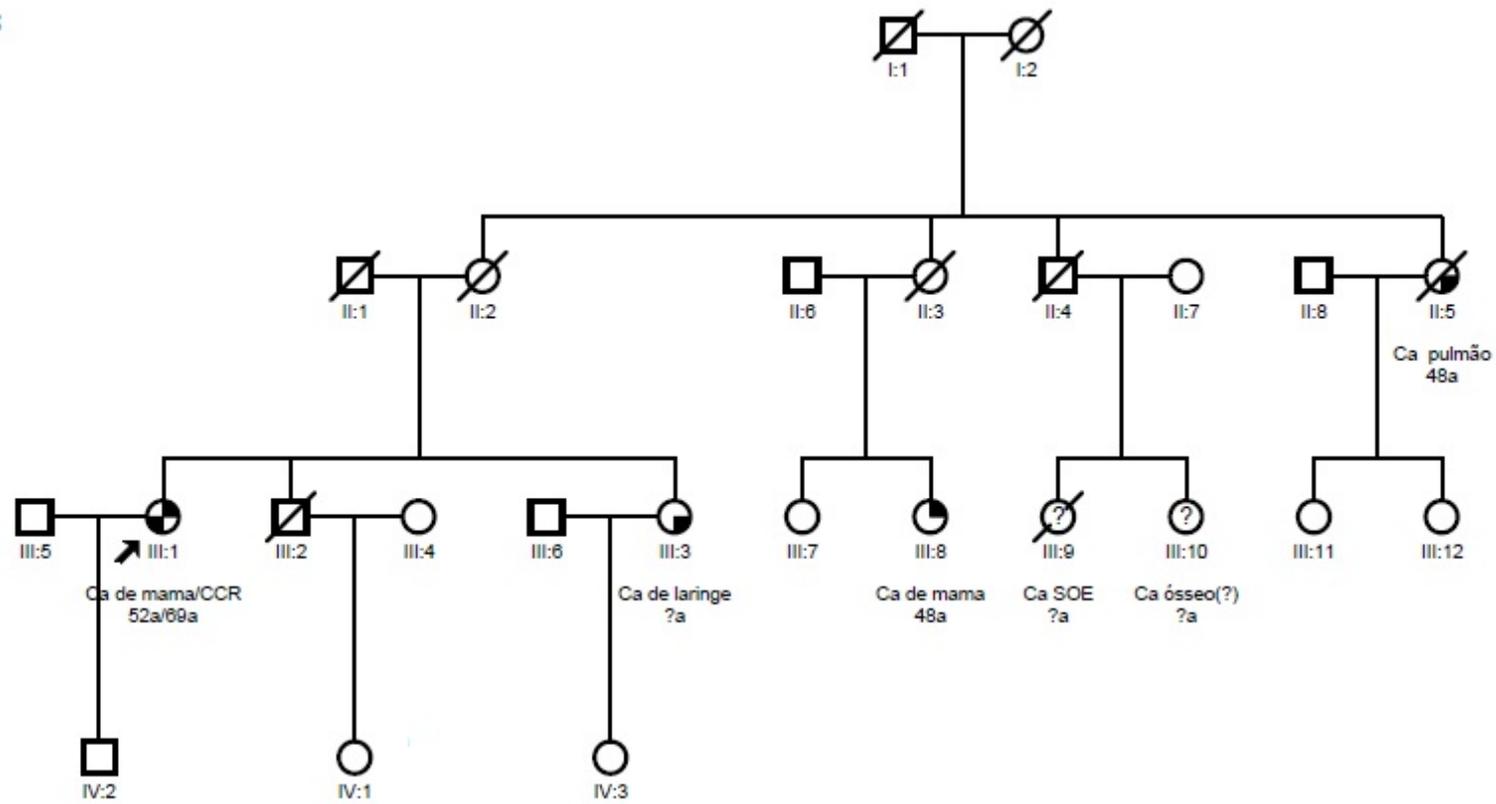
Symbol definitions	
□	○ Clear symbol
◼	◉ Metaplastic esophageal
◻	◐ Breast
◻	◑ Stomach
◻	◒ Unknown
◻	◓ Colon
◻	◔ Polycystic kidney
◻	◕ Mammary dysplasia

SM186

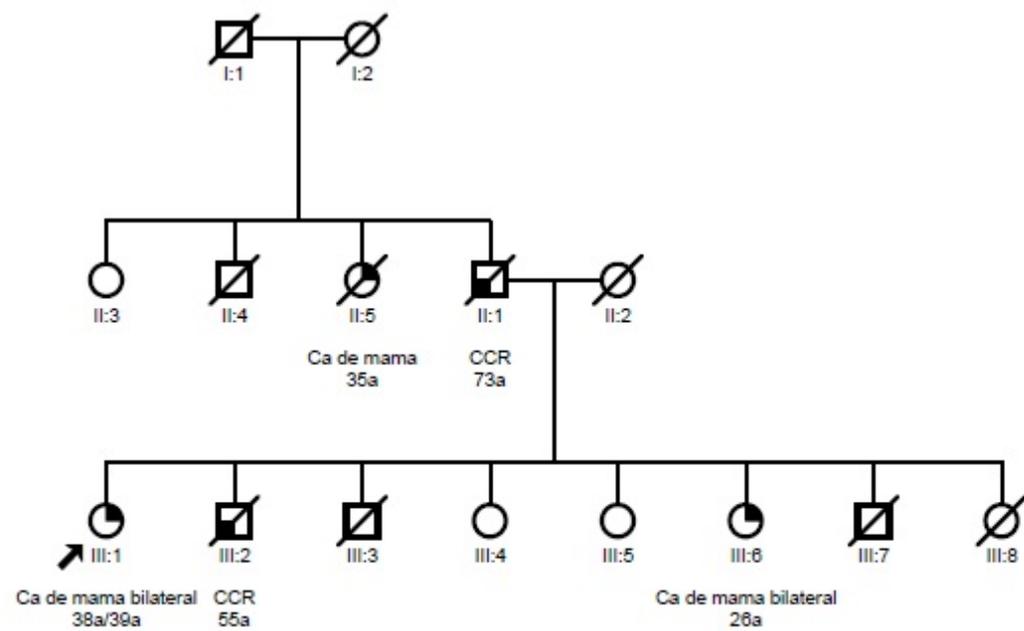


Symbol definitions	
□ ○	Clear symbol
■ ●	Breast
▣ ●	Colon
▤ ●	Stomach
▥ ●	Kidney
▧ ●	Uterine

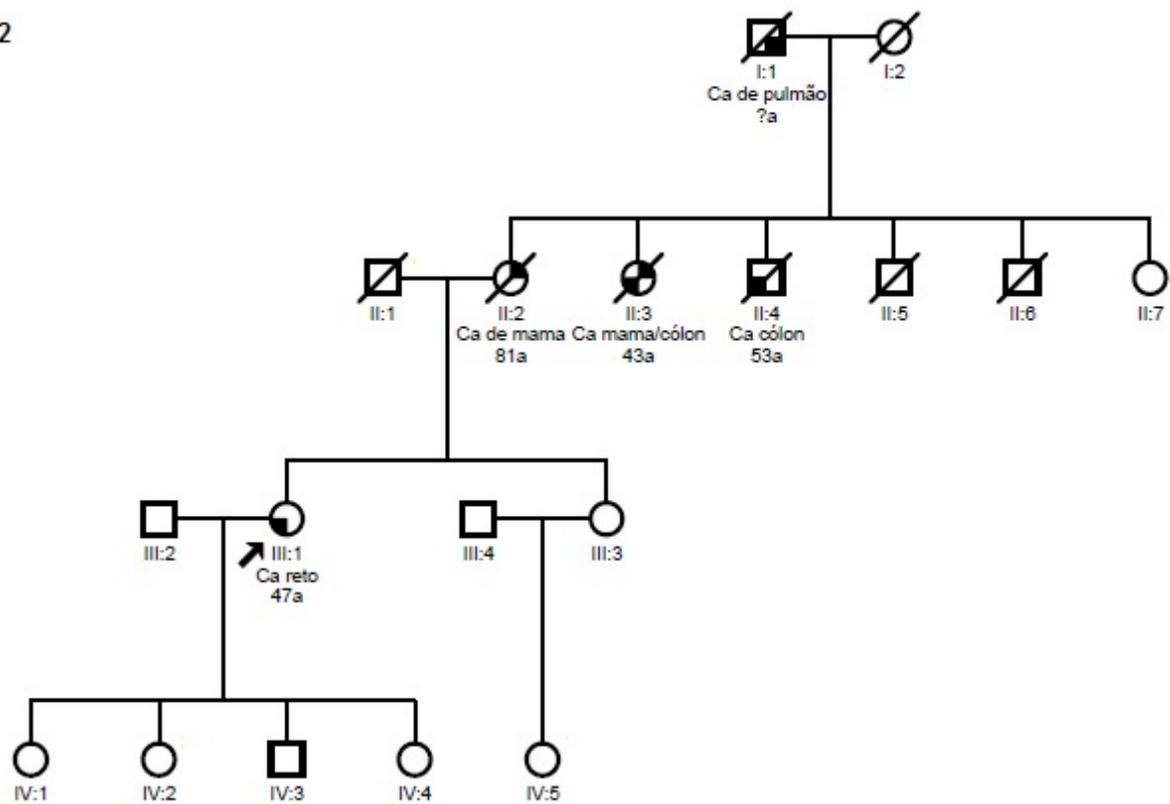
SM88



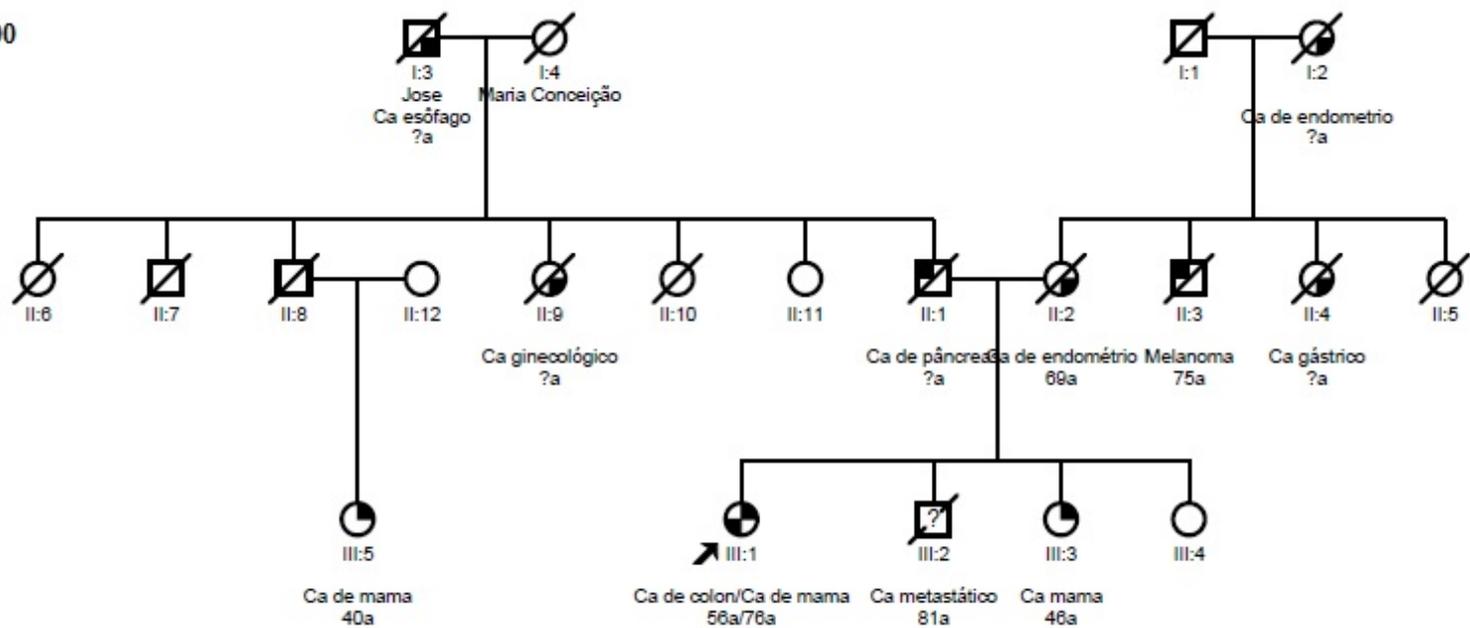
SM91



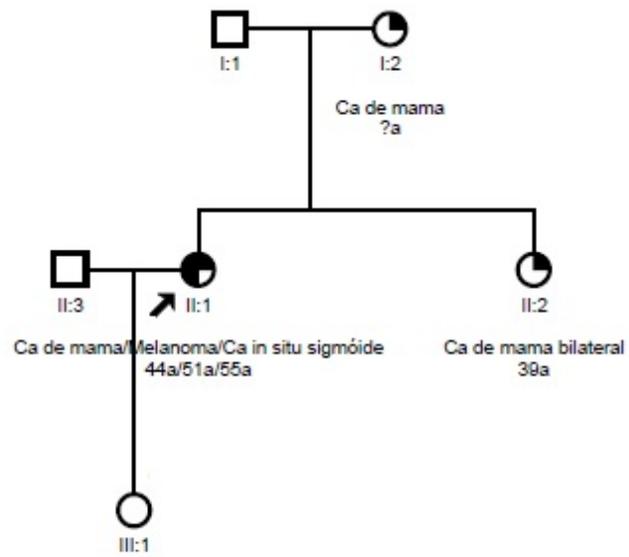
SM92



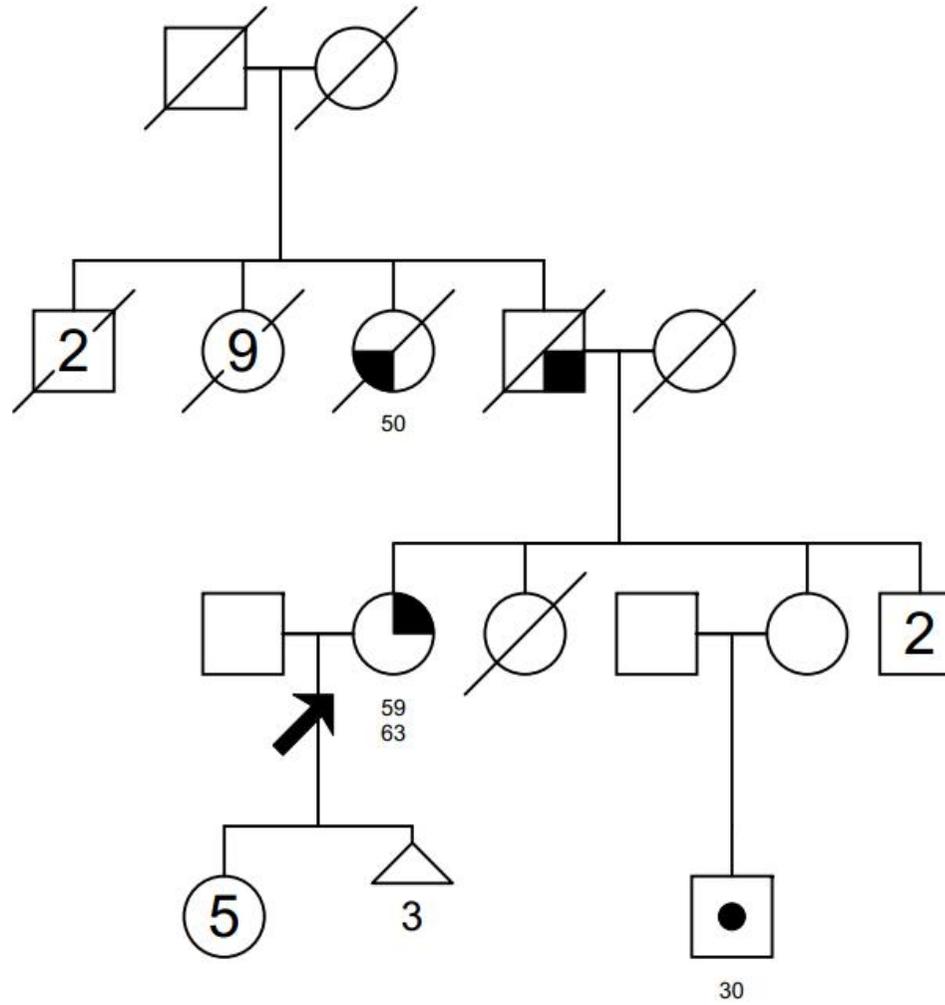
SM100



SM101

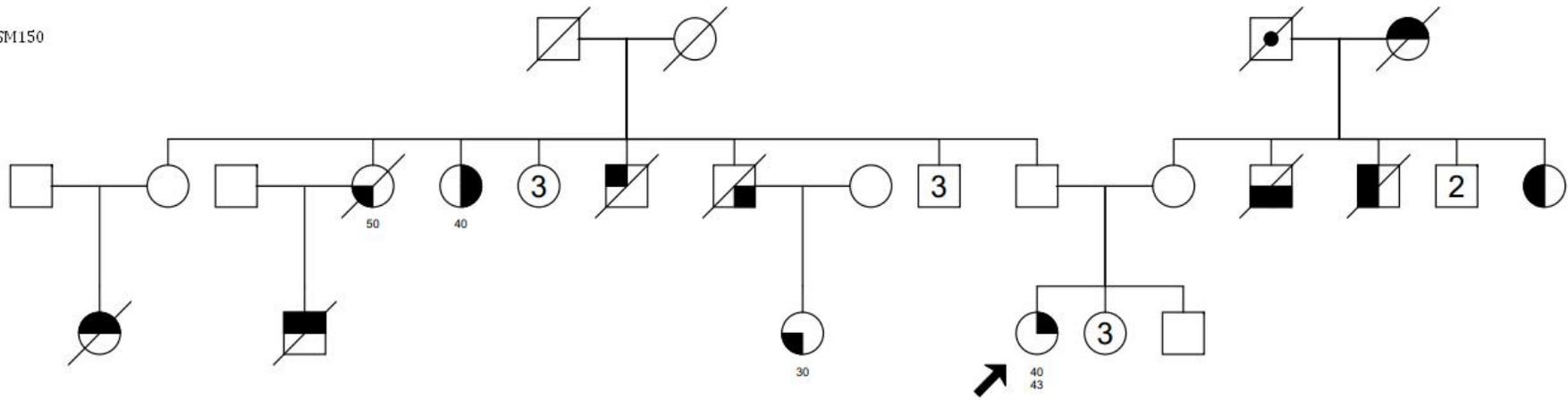


SM102



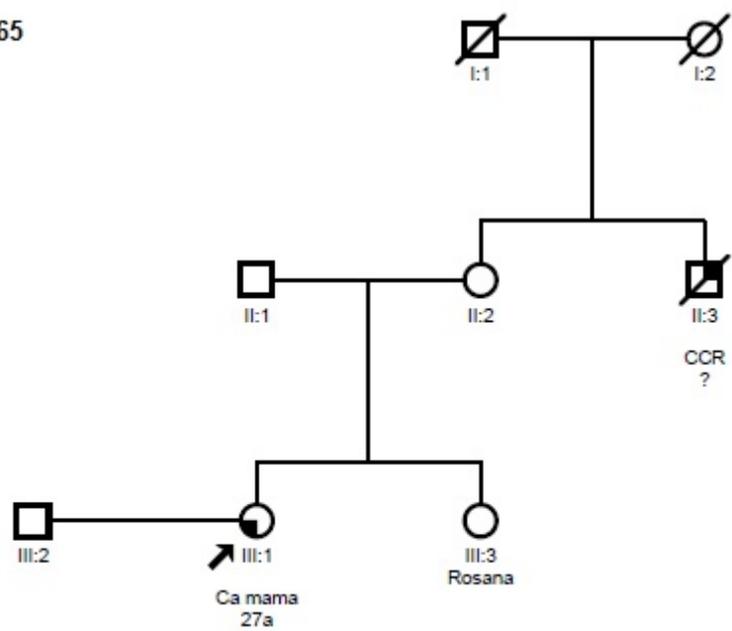
Symbol definitions	
	Clear symbol
	Poliposys
	Colon/Breast
	Brain
	Colon
	male
	female
	Spontaneous abortion

SM150



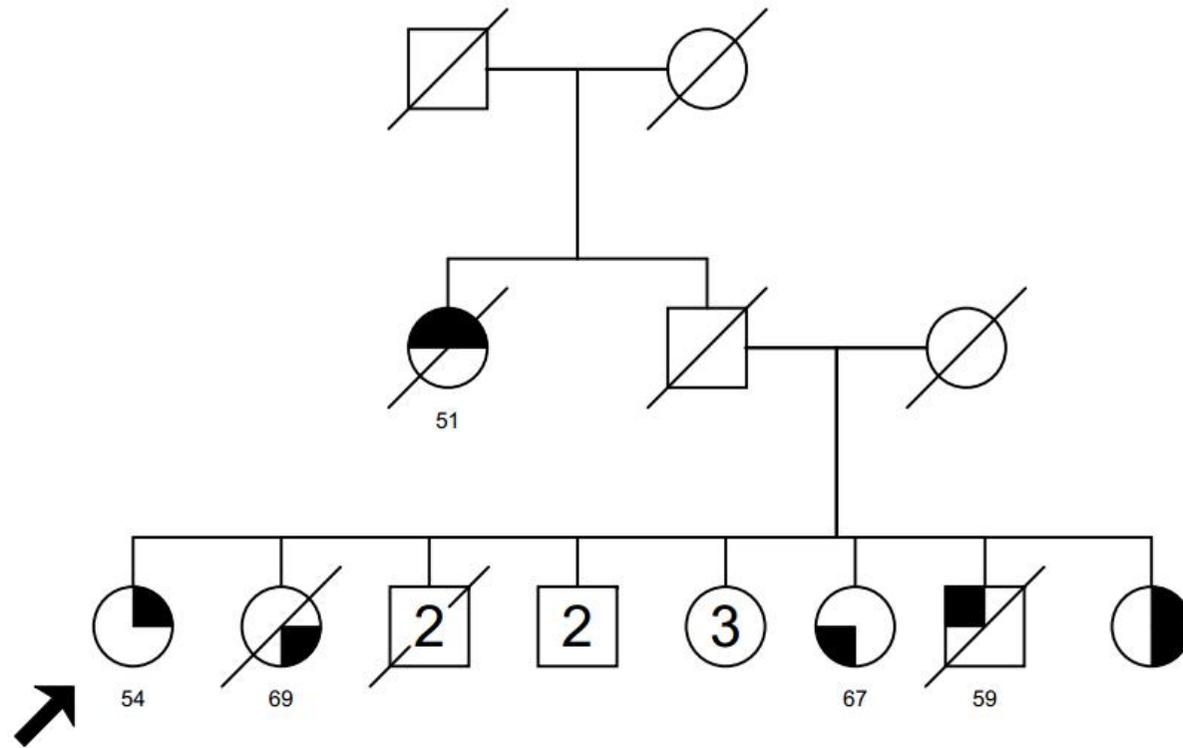
Symbol definitions	
□	○ Clear symbol
◻	◉ Larynx
◻	◐ Breast/Colon
◻	◑ Liver
◻	◒ Breast
◻	◓ Leukemia
◻	◔ Colon
◻	◕ Unknown
◻	◖ Lung
◻	◗ Kidney

SM165

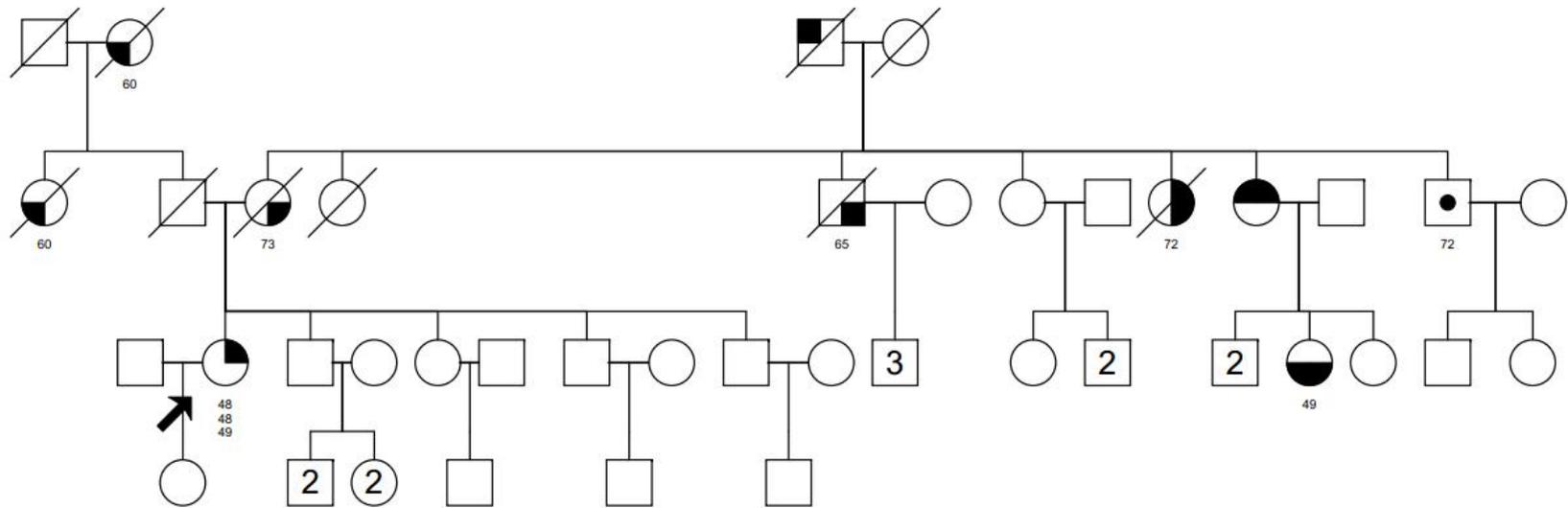


SM1174

Symbol definitions	
	Clear symbol
	Colon
	Ovary
	Breast
	Prostate
	Adenoma
	Unknown



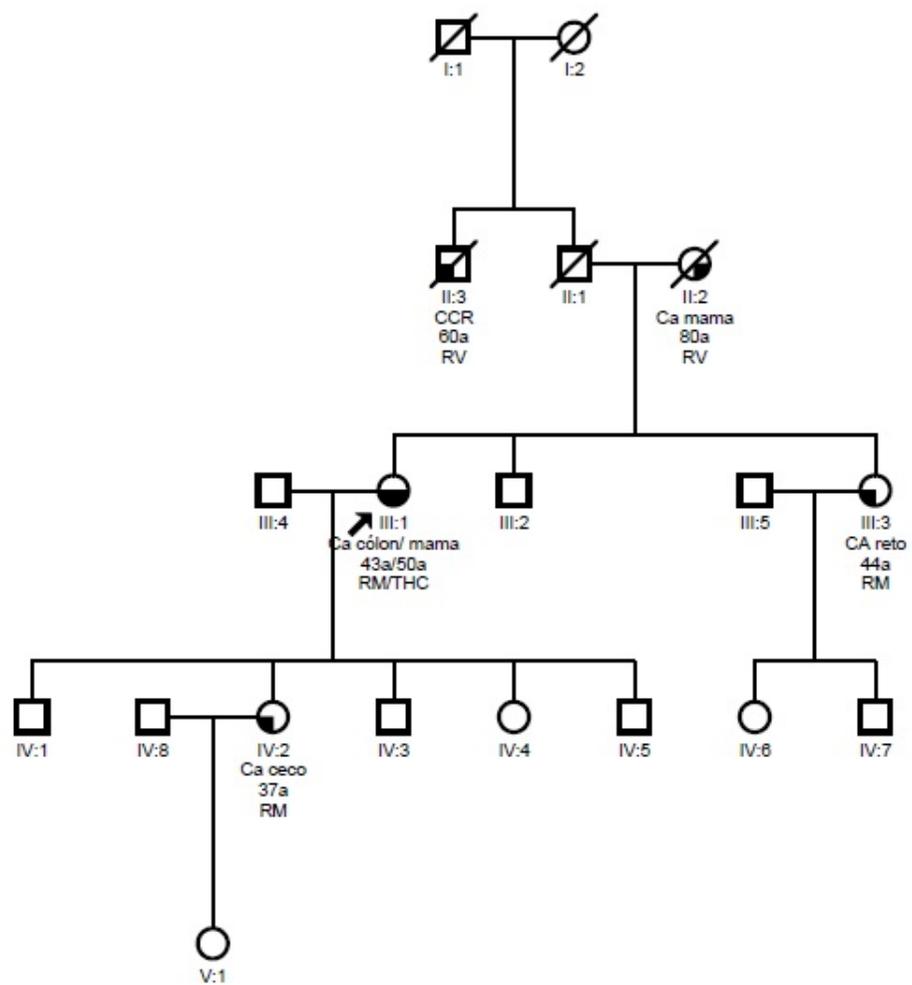
SL16



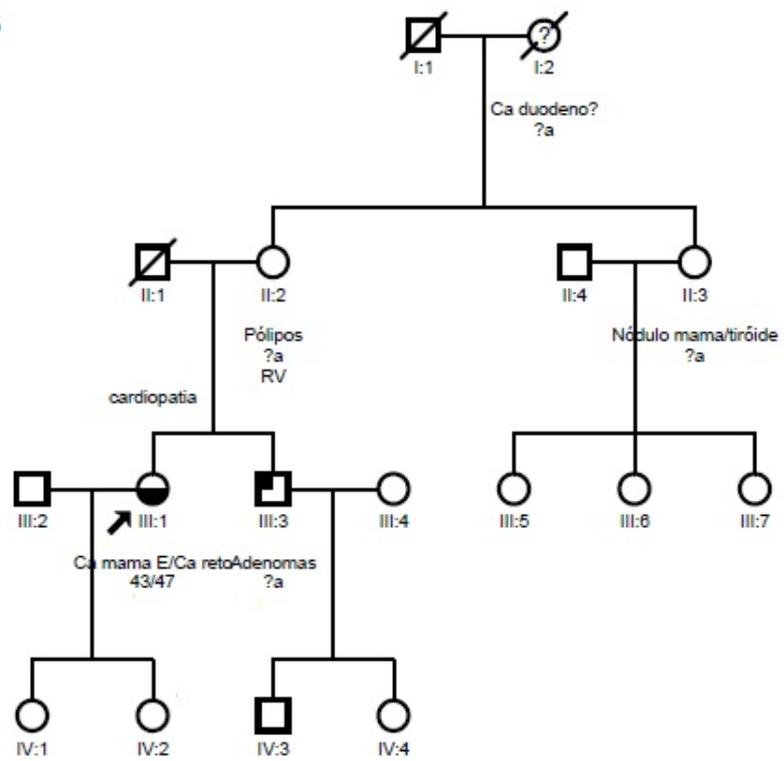
Symbol definitions	
□ ○	Clear symbol
■ ●	Prostate
▣ ●	Colon/Adenoma/Breast
▤ ●	Colon
▥ ●	Breast
▧ ●	Lung
▨ ●	Meningioma
▩ ●	Pancreatic
▫ ●	Hemangiopericytoma



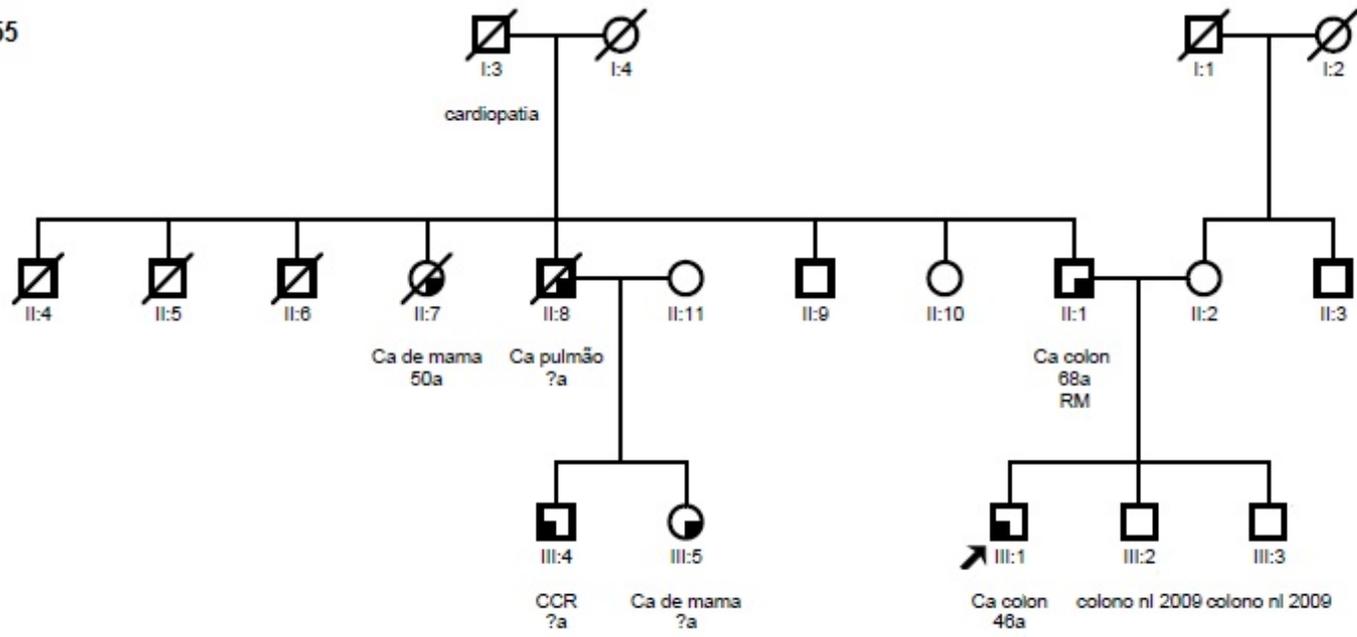
SL36



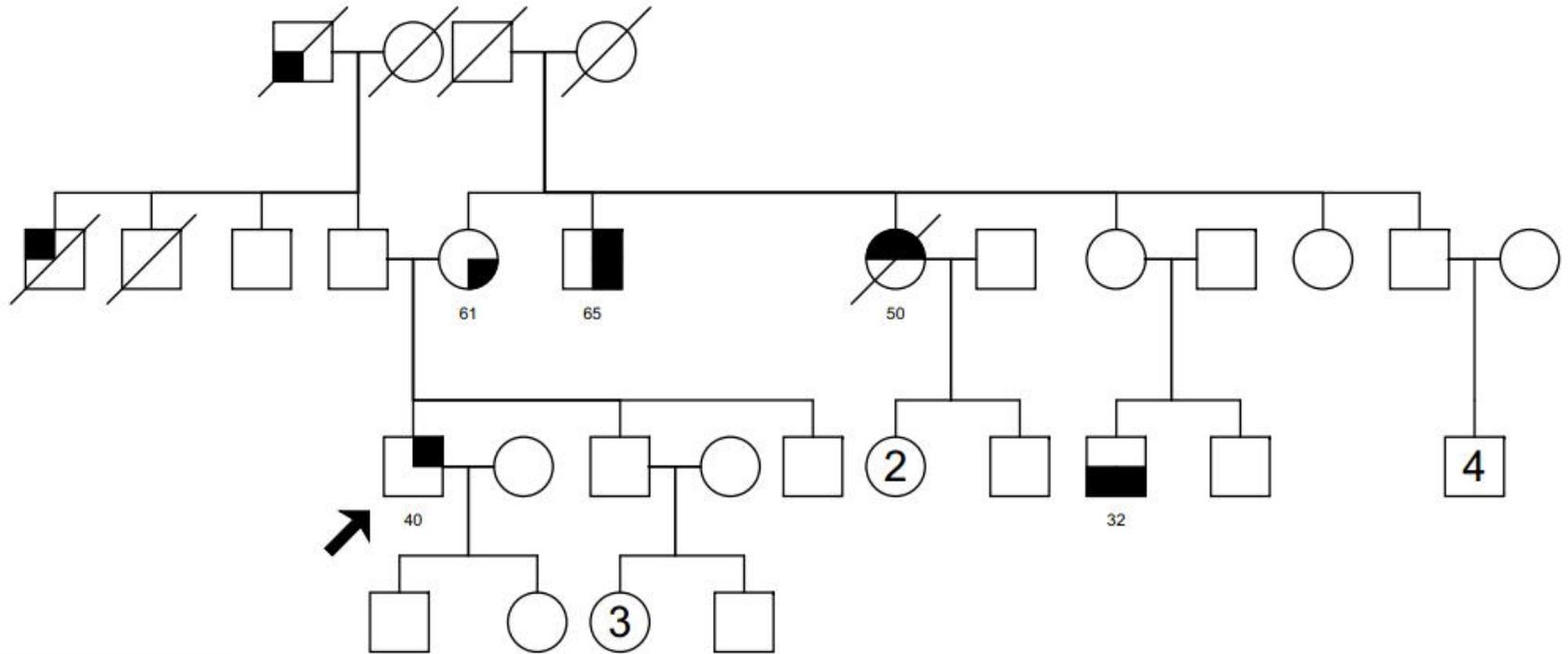
SL55



SL155

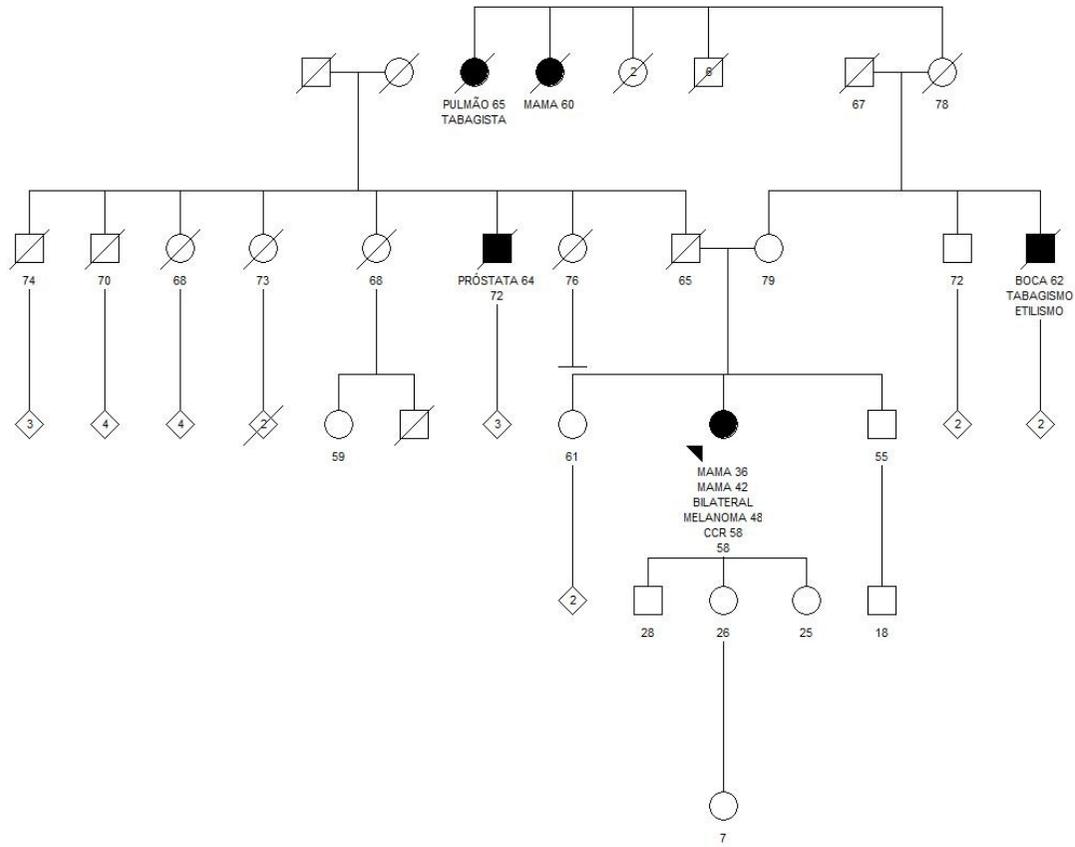


SL167

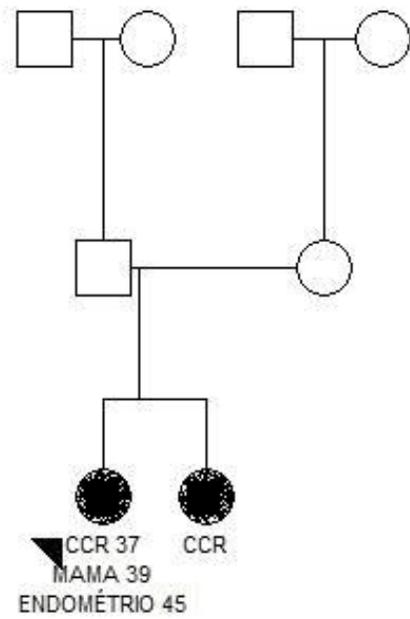


Symbol definitions	
	Clear symbol
	Colon/Polyposis
	Adenoma
	Mouth
	Lung
	Colon
	Breast
	Lymphoma

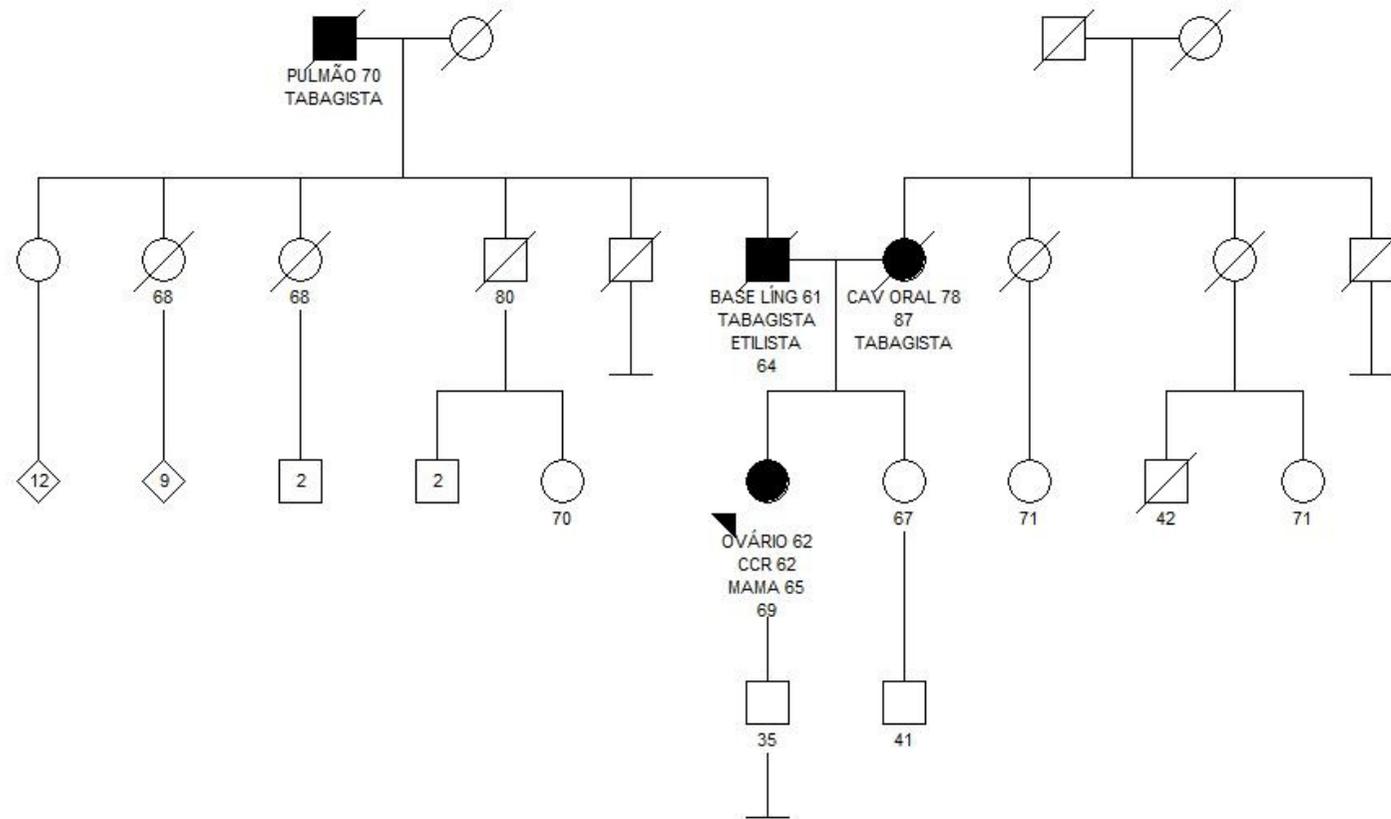
MT-5



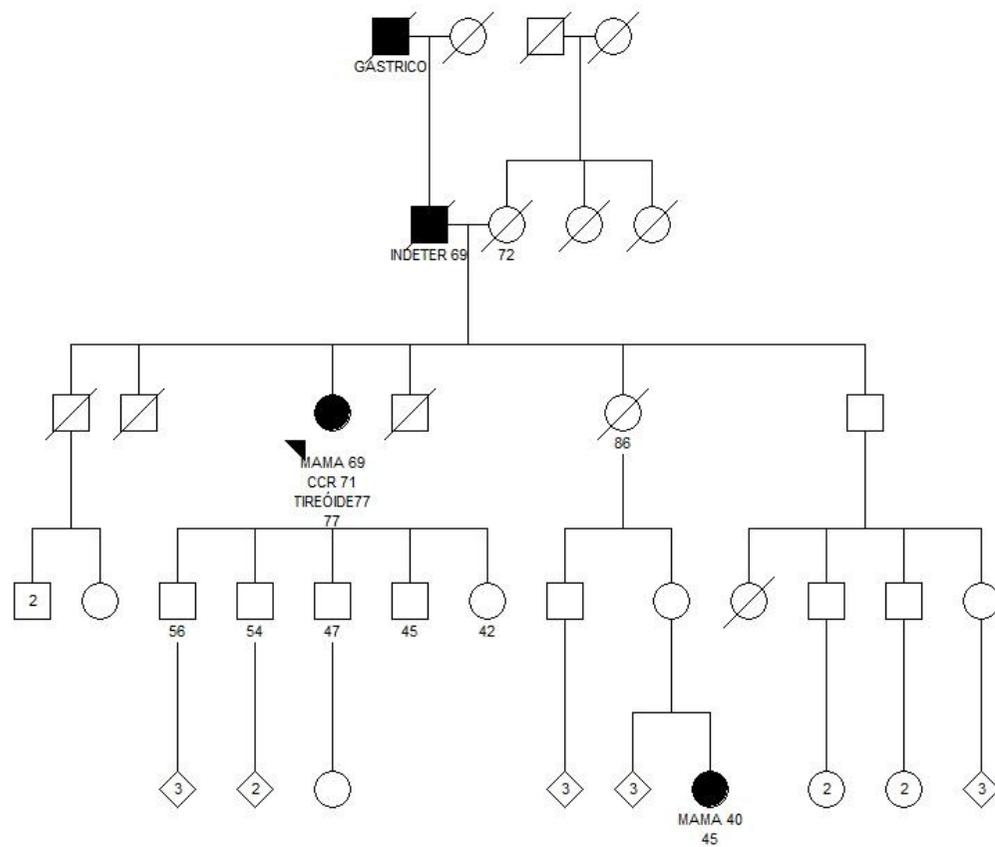
MT-16



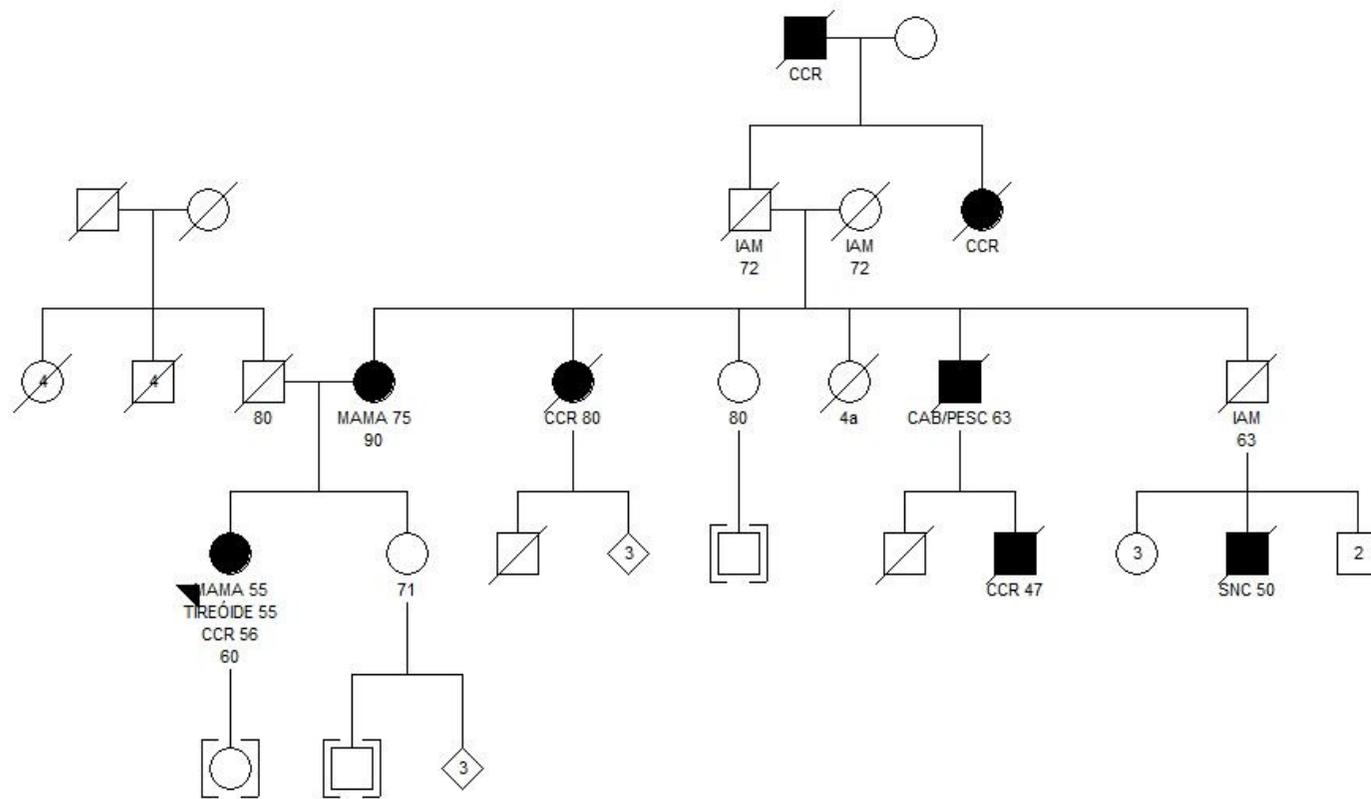
MT-28



MT-39



MT-67



**Anexo 2** - Critérios de Amsterdam I (VASEN et al. 1991) e II (VASEN et al. 1999) para diagnóstico clínico da Síndrome de Lynch.

**1. Critério de Amsterdam I**

Pelo menos três membros de uma mesma família com câncer colorretal:

- ✓ Um dos membros deve ser parente em primeiro grau dos outros dois;
- ✓ Pelo menos duas gerações devem ser acometidas pela doença;
- ✓ Pelo menos um dos membros deve ter sido diagnosticado com a doença antes dos 50 anos de idade;
- ✓ Exclusão dos casos de polipose adenomatosa familiar (FAP).

**2. Critério de Amsterdam II**

Pelo menos três membros de uma mesma família com câncer colorretal ou tumores associados com a doença, como câncer de endométrio, câncer de pelve renal, câncer de ureter ou câncer de intestino delgado:

- ✓ Um dos membros deve ser parente em primeiro grau dos outros dois;
- ✓ Pelo menos duas gerações devem ser acometidas pela doença;
- ✓ Pelo menos um dos membros deve ter sido diagnosticado com a doença antes dos 50 anos de idade;
- ✓ Exclusão dos casos de polipose adenomatosa familiar (FAP).

**Anexo 3** - Critérios de Bethesda para o rastreamento de indivíduos suspeitos para Síndrome de Lynch (UMAR et al. 2004).

#### **Critério de Bethesda**

- ✓ Diagnóstico de câncer colorretal antes dos 50 anos de idade;
- ✓ Presença de câncer colorretal sincrônico ou metacrônico, ou um tumor extracolônico associado à síndrome, independentemente da idade;
- ✓ CCR com histologia de alto-MSI diagnosticado em paciente com menos de 60 anos;
- ✓ Um indivíduo diagnosticado com CCR e um parente de primeiro grau com tumor relacionado à síndrome, com um dos tumores tendo sido diagnosticado antes dos 50 anos;
- ✓ Um indivíduo diagnosticado com CCR com um ou dois parentes de primeiro ou segundo grau com tumor relacionado à síndrome, independentemente da idade.