

**ALTERAÇÕES GERMINATIVAS EM
PACIENTES COM CÂNCER DE RETO EM
IDADE JOVEM**

CAROLINE MORAES BELTRAMI

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

Área de Concentração: Oncologia

Orientador: Dra. Silvia Regina Rogatto

Co-orientador: Dra. Sandra Aparecida Drigo Linde

São Paulo

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Beltrami, Caroline Moraes

Alterações germinativas em pacientes com câncer de reto em idade jovem
/ Caroline Moraes Beltrami – São Paulo 2019.

148p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientadora: Silvia Regina Rogatto

Descritores: 1. Neoplasias Colorretais/genética/Colorectal Neoplasms/
genetics. 2. DNA/DNA. 3. Sequenciamento de Nucleotídeos em Larga escala/
High-Throughput Nucleotide Sequencing. 4. Patologia Molecular/Pathology,
Molecular. 5. Hereditariedade/Heredity. 6. Detecção Precoce de Câncer/Early
Detection of Cancer

Um cientista que também é um ser humano não deve descansar enquanto o conhecimento que pode reduzir o sofrimento repousa em uma estante

(Albert Sabin 1906-1993)

DEDICATÓRIA

A todos os pacientes e familiares que entenderam o valor da pesquisa e acima de todas as dificuldades contribuíram para desenvolvimento deste trabalho. O meu sonho é que um dia todos vocês sejam beneficiados pelas descobertas científicas e que estas tenham impacto na vida de muitos!

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, que ao longo desta jornada me ensinou a vê-Lo como Pai e amigo. Serei eternamente grata pelo presente de Sua maravilhosa graça sobre mim e minha família. Que tudo seja para Sua glória, sempre.

Aos meus pais, **Claudinei** e **Regina**, pelo amor incondicional, por sempre me fortalecerem com suas orações e palavras, por me apoiarem em meus sonhos, e pela dedicação em me proporcionar todas as condições necessárias para que eu pudesse alcançar os meus objetivos. Eu nunca conseguirei retribuir tudo o que já fizeram e ainda fazem por mim. Obrigada por tanto!

Aos meus irmãos, **Feline** e **Filipe**, cunhada, **Elizabeth**, e sobrinhos, **Eduarda** e **Enzo**, por me apoiarem e me incentivarem em cada etapa de minha vida, e por me ensinarem tanto, especialmente sobre amor e companheirismo. Obrigada pelos momentos que compartilhamos e por sempre se fazerem presentes. Tudo faz sentido quando olho para o lado e vejo vocês.

Ao meu noivo **William**, pelo carinho desde o primeiro encontro, por ter me esperado e provado o seu amor quando estivemos a quilômetros de distância, pelo cuidado, bondade e paciência. Obrigada por investir nos meus sonhos, por acreditar em mim e neste trabalho, e por ser o meu melhor amigo. Com você eu descobri a melhor versão de mim. Obrigada por ser tão especial!

À **Dra. Silvia Regina Rogatto**, pela excelente orientação, por me desafiar a continuar mesmo diante de tantas dificuldades e sempre exigir o meu melhor. Obrigada por todas as oportunidades e investimento em minha formação, pela sua qualidade humana e apoio constante. Agradeço também, por todas as sugestões e críticas construtivas que contribuíram muito para o desenvolvimento deste trabalho. Obrigada pela confiança!

À Dra. **Sandra Aparecida Drigo Linde**, que mesmo a distância sempre foi muito solícita e disposta a contribuir para o desenvolvimento deste trabalho. Obrigada pelas aulas, conversas, discussões que abriram a minha mente para o conhecimento.

À **Dra Luisa Canto e Dominique**, pela amizade que construímos, pelos momentos incríveis e rotina gostosa que partilhamos, por me incentivarem nos momentos difíceis e acreditarem em mim. A vocês, que eu tanto admiro e aprendi a amar, o meu muito obrigada – por tudo!

Aos amigos e colegas de **Laboratório** (Fabio, Fernanda, Graziela, Hellen, Isabella, Júlia, Luisa, Karina, Kevin, Máisa, Mateus e Tatiane) pelas conversas, risadas, conselhos, colaborações e muito aprendizado ao longo destes anos de convivência.

A todos os **funcionários do Centro Internacional de Pesquisa**, em especial à **Jennice**, por sempre ajudar a todos e pelo suporte para o desenvolvimento deste estudo, ao **Calebe** pela colaboração no levantamento de dados, ao **Alexandre** pela contribuição na análise dos dados, e a **Karina** por toda ajuda prática e pessoal ao longo destes anos.

Ao **Banco de Macromoléculas**, especialmente à **Ana** e à **Fernanda**, pela extração dos ácidos nucleicos com excelente qualidade, e pela proatividade e gentileza em sempre atender os nossos pedidos com eficiência e agilidade.

Ao **Comitê de Ética em Pesquisa**, especialmente à **Sandra**, pela paciência em sanar todas as dúvidas e atender as demandas exigidas pelo estudo, pela troca de experiências, pela amizade que desenvolvemos e pelos momentos que compartilhamos.

A equipe do **Departamento de Oncogenética** por me receber de braços abertos para que eu pudesse acompanhar as consultas e dividir o espaço para convidar alguns familiares para participarem desta pesquisa. À **Gislaine** pela companhia nos dias de coleta e zelo pela pesquisa. À **Dra Maria Nirvana**, pela excelente colaboração e

humildade, além da contribuição na convocação de pacientes, revisão e discussão de dados.

Aos demais colaboradores **Dr. Luiz Paulo Kowalski** e **Dr. Samuel Aguiar Junior** por terem apostado na realização deste trabalho.

Ao **Departamento de Genética Clínica da Universidade do Sul da Dinamarca** pelos incríveis três meses de aprendizado e crescimento (humano e científico). Em especial, à **Helle E** pelo suporte no desenvolvimento dos experimentos, e à **Annabeth** e ao **Mads**, pela contribuição nas análises de dados.

Aos **membros da banca examinadora**, por aceitarem o convite, por compartilharem seus conhecimentos e experiências profissionais, e colaborarem para o aperfeiçoamento deste trabalho.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pelo suporte financeiro.

Em especial, gostaria de agradecer a todos os **pacientes** e **familiares**, que prontamente se dispuseram a participar deste estudo proporcionando o material biológico necessário. Ter este contato pessoal com cada um de vocês me tornou mais sensível, humana e profissional. Obrigada por serem fonte de conhecimento profissional e aperfeiçoamento humano.

RESUMO

Beltrami CM. **Alterações germinativas em pacientes com câncer de reto em idade jovem**. São Paulo; 2019. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

O câncer colorretal (CCR) é o terceiro tipo de câncer mais comum no mundo e a segunda causa de morte por câncer. Dados atuais apontam que o câncer de reto (CaRe) contribui para a maior incidência de CCR observada em pacientes jovens e é responsável por um aumento destes tumores em cerca de 75% nos últimos 40 anos. As variantes germinativas são reportadas em 14 a 16% dos indivíduos jovens com CCR, independente de história familiar de câncer. Ainda assim, a causa do desenvolvimento de CCR na maioria dos casos de indivíduos jovens ou famílias com múltiplos indivíduos afetados permanece desconhecida. Neste estudo, foram investigadas variantes germinativas em 76 pacientes com CaRe incluindo 29 classificados pelos critérios de Amsterdam I/II para a Síndrome de Lynch (Grupo 1) e 47 pacientes com idade igual ou inferior 40 anos (Grupo 2). O objetivo principal foi identificar variantes em 93 genes relacionados ao câncer que possam contribuir para o risco de desenvolvimento da doença usando sequenciamento de alto desempenho. Quinze variantes foram selecionadas e avaliadas em membros de oito famílias. Foram identificadas 153 variantes envolvendo 65 genes. Pacientes com câncer de reto apresentaram alta frequência de variantes germinativas em *ATM* (19%), *APC* (10%) e *BRCA2* (9%). Variantes patogênicas ou *likely*-patogênicas foram identificadas em genes de alta (*MSH2*, *MSH6*, *MLH1*, *MUTYH* e *BRCA2*), moderada (*ATM*) e baixa (*MTHFR* e *NOTCH1*) penetrância, em 18% (14/76) dos pacientes, concordante com dados da literatura. Variantes características da Síndrome de Lynch foram identificadas em seis pacientes (6/76) e variantes associadas à polipose no gene *MUTYH*, em dois pacientes (2/76). Variantes patogênicas ou *likely*-patogênicas foram identificadas em 17% (8/47) dos pacientes jovens, especialmente em *MUTYH* (3/47), *MTHFR* (2/47), *ATM*, *MSH6* e *MLH1* (1/47 cada). Dentre estes, dois de 14 pacientes não reportaram câncer na família e seis tiveram pelo menos um caso de câncer na família, mas não preencheram os critérios clínicos para síndrome de predisposição

hereditária ao câncer. Este estudo revelou 25 variantes novas (não identificadas em bancos de dados públicos ou reportadas em literatura). Em adição, foram observadas variantes germinativas em diferentes genes das vias MMR e de recombinação homóloga, incluindo *ATM*, *BRCA2* e *POLD1*. Foram identificadas 15 variantes candidatas e ou associadas ao fenótipo nos genes *ATM*, *APC*, *MSH2*, *MTHFR*, *CDKN2A*, *MUTYH* e *POLD1*. Essas variantes foram avaliadas em 20 indivíduos de 8 famílias, sendo confirmadas nos probandos e identificadas em mais de um membro das famílias investigadas. A identificação de genes associados à predisposição ao CaRe tem potencial importância para o delineamento de estratégias mais eficientes de diagnóstico e aconselhamento genético em famílias com um alto risco de desenvolver este tumor.

Descritores: Neoplasias Colorretais/genetica. DNA. Sequenciamento de Nucleotídeos em Larga escala. Patologia Molecular. Hereditariedade. Detecção Precoce de Câncer.

SUMMARY

Beltrami CM. **Germline alterations in patients with rectal cancer at a young age.** São Paulo, 2019. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Colorectal cancer (CRC) is the third most common cancer worldwide and the second leading cause of cancer-related death. Recent studies suggest that rectal cancer (ReCa) contributes to the higher CRC incidence observed in young patients, and it is responsible for 75% of the increased incidence in colorectal tumors over the last 40 years. Germline variants have been reported in 14-16% of patients with early-onset CRC, regardless of family history of cancer. Nonetheless, the causes of CRC onset in most young patients or families with multiple affected cases remain unknown. We investigated germline variants in 76 ReCa patients, including 29 cases classified by the Amsterdam I/II criteria for Lynch Syndrome (Group 1) and 47 early-onset ReCa patients (≤ 40 years old, Group 2). The main objective was to identify variants in 93 cancer-related genes that can contribute to increased risk of the disease development using next-generation sequencing. Fifteen candidate variants were evaluated in eight selected families. Next-generation sequencing revealed 153 variants involving 65 genes. ReCa patients showed high frequency of germline variants in *ATM* (19%), *APC* (10%) and *BRCA2* (9%). Pathogenic or likely-pathogenic variants were observed in high (*MSH2*, *MSH6*, *MLH1*, *MUTYH*, and *BRCA2*), moderate (*ATM*) and low (*MTHFR* and *NOTCH1*) penetrance genes, in 18% (14/76) of the patients, consistent with the literature data. Variants associated with Lynch Syndrome were identified in six patients (6/76), and variants involved in *MUTYH*-associated polyposis in two patients (2/76). Pathogenic or likely-pathogenic variants were identified in 17% (8/47) of early-onset patients, especially in the *MUTYH* (3/47), *MTHFR* (2/47), *ATM*, *MSH6*, and *MLH1* (1/47 each) genes. Among these, two of fourteen patients had no family history of cancer and six reported at least one case of cancer in the family, but none of them met clinical criteria for the hereditary cancer syndrome. This study revealed 25 new variants (not reported in public databases or previous studies). In addition, germline variants were observed in several genes involved in MMR and homologous

recombination (HR) pathways, including *ATM*, *BRCA2* and *POLD1*. Fifteen candidates and associated to the phenotype variants were identified in the *ATM*, *APC*, *MSH2*, *MTHFR*, *CDKN2A*, *MUTYH*, and *POLD1* genes. These variants were evaluated in 20 individuals (8 families), being confirmed in the index cases and identified in more than one relative of the evaluated families. The identification of genes associated with ReCa predisposition is crucial for outlining more efficient diagnostic strategies and for improving genetic counseling for families with high risk to develop this tumor type.

Key-words: Colorectal Neoplasms/genetics. DNA. High-Throughput Nucleotide Sequencing. Pathology, Molecular. Heredity. Early Detection of Cancer

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Mecanismo molecular do sistema de mismatch repair (MMR).....	17
Figura 2	Mecanismo molecular do sistema de recombinação homóloga (HR).	20
Figura 3	Pipeline utilizado para o processamento dos dados brutos gerados do sequenciamento de 93 genes relacionados ao câncer em amostras de pacientes com câncer de reto	52
Figura 4	A. Frequência de variantes classificadas como patogênicas, <i>likely</i> -patogênicas e de significado incerto em pacientes com câncer de reto. B. Tipo de variantes identificadas em pacientes com câncer de reto..	64
Figura 5	Variantes encontradas entre os 76 pacientes com câncer de reto classificadas de acordo com a patogenicidade segundo os critérios do <i>American College of Medical Genetics and Genomics-ACMGG</i> de 2018	73
Figura 6	Espectro de variantes patogênicas ou <i>likely</i> -patogênicas identificadas em pacientes com câncer de reto	78
Figura 7	Variantes germinativas em genes associados as vias (A) <i>mismatch</i> repair (MMR) e (B) recombinação homóloga (HR) em pacientes com câncer de reto	87
Figura 8	Análise supervisionada para investigar os 20 genes frequentemente alterados em pacientes com CaRe e as características clínicas e histopatológicas associadas a doença.....	92

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Síndromes hereditárias associadas ao carcinoma colorretal (CCR) e características relacionadas	7-9
Quadro 2	Critérios internacionais utilizados para o diagnóstico clínico de pacientes com Síndrome de Lynch denominados Amsterdam e Bethesda.....	12
Quadro 3	Dados em literatura utilizando a metodologia NGS para CCR familiar	27
Quadro 4	Dados em literatura utilizando a metodologia NGS para investigar CCR em idade jovem.....	35-6
Quadro 5	Dados dos pacientes com câncer de reto e com a Síndrome de Lynch (Amsterdam I, II ou Amsterdam -1 critério) do grupo I incluindo idade, gênero, história familiar de câncer e expressão das proteínas MMR (quando realizadas) nas amostras tumorais	40-1
Quadro 6	Dados dos pacientes (idade, gênero, história de câncer familiar e expressão das proteínas MMR nos tumores) com câncer de reto em idade jovem incluídos no Grupo 2.....	42-4
Quadro 7	Painel de 93 genes associados ao câncer avaliados neste estudo.....	47
Quadro 8	Genes e variantes selecionadas investigadas nos familiares de acordo com os critérios estabelecidos.....	56-7
Quadro 9	Dados dos genes, variantes e sequências avaliadas pelo sequenciamento de Sanger.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Dados clínicos e patológicos dos 76 pacientes incluídos no estudo, 29 do Grupo 1 e 47 do Grupo 2	61-2
Tabela 2	Dados resultantes da análise de sequenciamento em 29 pacientes com CaRe e história familiar de CCR (Grupo 1).....	66-8
Tabela 3	Dados resultantes da análise de sequenciamento em 47 pacientes com CaRe em idade jovem (Grupo 2)	69-72
Tabela 4	Variantes germinativas identificadas pela metodologia de tNGS em pacientes com CaRe.....	79
Tabela 5	Variantes compartilhadas em indivíduos não aparentados	83
Tabela 6	Genes da via MMR e HR alterados em pacientes com câncer de reto	85-6
Tabela 7	Alterações encontradas por NGS e investigadas por Sanger nos probandos e familiares	90
Tabela 8	Número de casos com variantes patogênicas e <i>likely</i> -patogênicas em <i>MUTYH</i> e em genes das vias MMR e HR e sua associação com características clínico-patológicas dos pacientes com CaRe	91

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACMG*	American College of Medical Genetics
AD	Autossômica Dominante
Adj	Adjuvante
AR	Autossômica Recessiva
Ca	Câncer
CaRe	Câncer de Reto
CCFTX	Câncer colorretal familiar do tipo X
CCR	Câncer Colorretal
CE	Câncer de Endométrio
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CNV*	Copy Number Variations
CONEP	Comitê Nacional de Ética em Pesquisa
dbNSFP*	Database for nonsynonymous SNPs' functional predictions
DNA*	Deoxyribonucleic Acid
DDR*	DNA damage response
DSB*	Double Strand Breaks
EC	Estadio Clínico
FAP*	Familial Adenomatous Polyposis
FDA*	Food and Drug Administration
GI	Gastrointestinal
Hm	Homozigoto
HR*	Homologous recombination
Ht	Heterozigoto
IHQ	Imuno-histoquímica
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LOH*	Loss of Heterozygosity
Mat	Materno (a)
MMR*	Mismatch Repair
MSI*	Microsatellite instability

NCCN*	National Comprehensive Cancer Network
NGS*	Next-Generation Sequencing
Ni	Não Informado
PAF	Polipose Adenomatosa Familiar
Pat	Paterno (a)
PCR*	Polymerase Chain Reaction
Qt	Quimioterapia
Rt	Radioterapia
SL	Síndrome de Lynch
SLL	Síndrome de Lynch-like
SNP*	Single Nucleotide Polymorphism
SNV*	Single Nucleotide Variants
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
tNGS*	target Next-Generation Sequencing
UTR*	Untranslated Region
VUS*	Variant of Uncertain Significance
WES*	Whole Exome Sequencing

* do inglês

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Carcinogênese colorretal.....	2
1.2	Câncer de reto em pacientes jovens	4
1.3	Síndromes hereditárias associadas ao CCR	6
1.3.1	Síndrome de Lynch	10
1.4	Mecanismos de reparo a danos no DNA.....	14
1.4.1	Reparo a erros de pareamento (<i>mismatcha reparis – MMR</i>)	15
1.4.2	Recombinação homóloga (<i>homologous recombination – HR</i>).....	18
1.5	Alterações genômicas em pacientes com câncer colorretal hereditário.....	22
1.6	Sequenciamento de alto desempenho em pacientes com história familiar de CCR.....	24
1.7	Sequenciamento de alto desempenho em pacientes jovens com CCR	32
2	OBJETIVOS.....	37
2.1	Objetivo Geral.....	37
2.2	Objetivos Específicos.....	37
3	CASUÍSTICA	38
4	MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1	Extração de DNA	45
4.2	Sequenciamento de alto desempenho em genes alvos	46
4.3	Análise estatística.....	54
4.4	Confirmação das alterações	54
5	RESULTADOS	60
5.1	Análise dos Dados de Sequenciamento	63
5.2	Comparação entre as Características Clínicas e Moleculares dos Pacientes Incluídos no Estudo.....	74

5.2.1	Variantes com potencial efeito de risco para o desenvolvimento do câncer de reto.....	76
5.3	Variantes de Significado Incerto em Pacientes com Câncer de Reto	79
5.3.1	Alterações compartilhadas entre pacientes não aparentados	82
5.4	Pacientes com Câncer de Reto apresentam Deficiência nas Vias MMR e HR	85
5.5	Associação dos Achados com Características Clínico-Patológicas.....	88
5.6	Confirmação das Alterações Candidatas em Pacientes Seleccionados com Câncer de Reto e seus Familiares	93
6	DISCUSSÃO.....	99
7	CONCLUSÃO.....	125
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	126

ANEXOS

Anexo 1 Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP.

Anexo 2 Laudo de teste genético do indivíduo B15.

Anexo 3 Laudo de teste genético do indivíduo B15-1.

APÊNDICES

Apêndice 1 Cobertura média e porcentagem das sequências com cobertura de pelo menos 20, 30 e 100 vezes das regiões exônicas obtidas com o sequenciador NextSeq para as amostras dos Grupos 1.

Apêndice 2 Cobertura média e porcentagem das sequências com cobertura de pelo menos 20, 30 e 100 vezes das regiões exônicas obtidas com o sequenciador NextSeq para as amostras dos Grupos 2.

Apêndice 3 Variantes germinativas identificadas nos pacientes do Grupo 1.

Apêndice 4 Variantes germinativas identificadas nos pacientes do Grupo 2.

Apêndice 5 Eletroferogramas representando as variantes avaliadas em cada família.

1 INTRODUÇÃO

O câncer colorretal (CCR) é o terceiro tipo de câncer mais comum no mundo e representa a segunda causa de morte por câncer (FERLAY 2019). Apesar disso, estudos recentes observaram um declínio na incidência de CCR em muitos países, possivelmente devido a melhoria nos programas de rastreamento (ARNOLD et al. 2017; LUI et al. 2019). Por outro lado, nas últimas décadas têm sido observado um aumento nas taxas de CCR na população mais jovem, especialmente o câncer de reto (CaRe) (DEEN et al. 2016; SIEGEL et al. 2017; SEGEV et al. 2018; LUI et al. 2019).

O câncer de reto (CaRe) representa a sétima neoplasia maligna mais incidente no mundo e a décima principal causa de morte por câncer (FERLAY 2019). Estimativas mundiais para 2018 revelaram que este tumor ocorreu em 704 mil novos casos sendo responsável por 310 mil óbitos (GLOBOCAN 2018; FERLAY et al. 2019). Segundo o GLOBOCAN (2018) foram registrados no Brasil 61.945 casos de CaRe e 24.146 óbitos. Esses dados correspondem ao oitavo (3%) tipo de câncer mais frequente na população brasileira e a décima segunda (3%) causa de óbito por câncer. Foram também reportados 22.624 novos casos de CaRe e 9.588 óbitos, no mundo, em indivíduos com até 39 anos, e de 968 casos novos e 289 óbitos em brasileiros na mesma faixa etária (FERLAY et al. 2018). Estima-se que, no total, até 2040 ocorrerá um aumento de aproximadamente 39 mil novos casos/ano e mais de 17 mil mortes por CaRe no Brasil (FERLAY et al. 2018).

A incidência do CaRe no Brasil não varia muito entre homens (11 mil) e mulheres (10.139 mil); no entanto, este tumor é notavelmente mais comum em homens

(430.230) do que em mulheres (274.146) na população mundial (BRAY et al. 2018; FERLAY et al. 2018). A frequência de óbitos por CaRe em homens (52%) e mulheres (48%) brasileiros é igual a da população mundial (FERLAY et al. 2018). Na população jovem, as taxas de incidência entre homens (11.437) e mulheres (11.187) são bastante similares na população mundial, enquanto que no Brasil este tumor é mais comum em mulheres (612) do que em homens (356). A taxa de mortalidade não varia muito entre os sexos na população mundial (5.062 homens e 4.526 mulheres) e brasileira (134 homens e 155 mulheres) (FERLAY et al. 2018).

Segundo o relatório do *World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research* (2018), carnes processadas, bebidas alcoólicas e obesidade podem aumentar o risco para esta neoplasia. Estudos recentes mostraram que a obesidade está associada com um aumento no risco de CCR em pacientes jovens e que o consumo excessivo de açúcar pode contribuir para tumorigênese colorretal (LIU et al. 2019; GONCALVES et al. 2019). Entretanto, os estudos avaliando o risco de câncer de reto associado à alimentação ainda são inconsistentes (WU et al. 2018).

1.1 CARCINOGENESE COLORRETAL

A maioria dos tumores colorretais surge a partir de lesões benignas, denominadas pólipos, as quais podem se desenvolver no revestimento interno do cólon ou do reto (FEARON e VOGELSTEIN 1990). O adenoma é a lesão benigna mais comum e surge a partir das células glandulares, as quais produzem o muco lubrificante do intestino. Embora sejam muito comuns na população e todos os adenomas tenham potencial para transformação maligna, menos de 10% evoluem para o câncer

(LEVINE e AHNEN 2006). A predisposição genética, devido a variantes germinativas patogênicas em genes de alto risco associados ao câncer, é responsável por 2 a 8% de todos os casos de CCR e um em cinco casos diagnosticados antes do 50 anos (ALDUBAYAN et al. 2018; STOFFEL et al. 2018; VALLE et al. 2019).

Essa doença é potencialmente curável quando os tumores são detectados e removidos em estágios iniciais (GONZALEZ-PONS e CRUZ-CORREA 2015). Atualmente, os métodos disponíveis para a detecção da doença incluem a colonoscopia, sigmoidoscopia flexível, tomografia computadorizada de cólon e reto (colonoscopia virtual), exame de sangue oculto nas fezes e análise de sequências específicas de DNA presente nas fezes (Cologuard) (GONZALEZ-PONS e CRUZ-CORREA 2015). Este último ensaio foi aprovado pelo *Food and Drug Administration*-FDA, Estados Unidos em 2014 e é baseado em testes moleculares para a detecção de mutações e metilação (incluindo mutação em *KRAS* e hipermetilação em *NDRG4* e *BMP3*) no DNA liberado de células que são constantemente eliminadas de lesões pré-malignas e cânceres em estágio inicial e tardio. Além destes, há um teste imunológico em fezes para avaliar a presença de hemoglobina (IMPERIALE et al. 2014).

A sobrevida do paciente com CCR é menor quando a doença é diagnosticada em estágios mais avançados. Em cinco anos, a sobrevida global média é de aproximadamente 65%, mas essa taxa pode ser de até 90% para pacientes com doença local e atingir 71% e 14% quando ocorrem metástases regionais e à distância, respectivamente (HOWLADER et al. 2016).

Pacientes jovens sem história de câncer na família são geralmente diagnosticados tardiamente e apresentam menor sobrevida. Este fato pode ser um

reflexo do rastreamento ser indicado apenas a partir dos 45 anos de idade (ou antes se houver casos de câncer na família) ou mesmo por negligência ao subestimar a doença e seus sintomas em jovens (PROVENZALE et al. 2015; KHAN et al. 2016).

O câncer de reto (CaRe) representa 38% dos casos de tumores colorretais e apresenta desafios importantes de mortalidade, morbidade e seguimento, devido aos limites anatômicos da pelve óssea e proximidade de estruturas neurovasculares significativas e outros sistemas orgânicos (KOKELAAR et al. 2016; FERLAY et al. 2018).

1.2 CÂNCER DE RETO EM PACIENTES JOVENS

A velocidade no aumento das taxas de incidência ao longo do tempo para o câncer retal é preocupante (DEEN et al. 2016; CROSBIE et al. 2018). A maioria dos trabalhos avaliando indivíduos jovens tem se concentrado em pacientes diagnosticados com menos de 40 ou 50 anos de idade. Nestes casos é observado que os tumores frequentemente desenvolvem-se do lado esquerdo do cólon, especialmente no reto (O'CONNELL et al. 2004; CRESS et al. 2006; SIEGEL et al. 2009; SEGEV et al. 2018).

Uma metanálise avaliando 39 artigos publicados em pacientes jovens com idade igual ou inferior a 40 anos em diferentes populações, identificou 22% dos tumores no cólon ascendente (incluindo ceco, cólon ascendente e flexura hepática), 11% no cólon transversal, 13% no cólon descendente (incluindo flexura esplênica e cólon descendente) e 54% no reto (incluindo a junção retosigmóide) (O'CONNELL et al. 2004). Nas últimas décadas, tem sido observado que o câncer de reto aumentou

significativamente em um ritmo mais acelerado quando comparado aos cânceres de cólon proximal e distal, e foi mais pronunciado em jovens de 20 a 49 anos de idade (CROSBIE et al. 2018; SEGEV et al. 2018).

A presença do CaRe em idade inferior a 40 anos, geralmente está associada ao estadiamento mais avançado e prognóstico desfavorável (O'CONNELL et al. 2003; CROSBIE et al. 2018). Pacientes jovens geralmente desenvolvem tumores sincrônicos e/ ou metacrônicos, estadiamento mais avançado, características de invasão tumoral linfovascular, grau III (alto grau), presença de células em anel de sinete e mucinosos e são pobremente diferenciados (GOLDVASER et al. 2016; BALLESTER et al. 2016).

Um estudo realizado por PIRZADA et al. (2017) comparando pacientes com CaRe com idade inferior ou igual a 40 anos (jovens) com aqueles acima de 40 anos revelou que entre os 209 pacientes jovens, apenas 27 tinham história familiar de câncer (qualquer câncer em membros da família). É bem estabelecido que o risco de desenvolver tumores em idade jovem está ligado a fatores genéticos e maior predisposição a síndromes hereditárias. É possível, portanto, que pacientes jovens com CaRe apresentem um componente hereditário associado à doença ainda que estes indivíduos não tenham história de câncer na família (FORD 2018). Nesses pacientes, em especial, é importante investigar se a doença está associada ao câncer colorretal (CCR) esporádico ou a alguma forma hereditária.

1.3 SÍNDROMES HEREDITÁRIAS ASSOCIADAS AO CCR

O CCR familiar representa 35% de todos os casos de CCR; no entanto, apenas 5-6% são explicados por mutações patogênicas em genes de alta penetrância com apresentações clínicas bem caracterizadas (STOFFEL e KASTRINOS 2014; MORK et al. 2015; GIGLIA e CHU 2016). As alterações associadas aos demais casos hereditários são pouco compreendidas, provavelmente por acometerem genes de baixa ou moderada penetrância, mais comuns do que aquelas associadas às síndromes bem caracterizadas (JASPERSON et al. 2010). Alternativamente, é possível que genes ainda não descritos ou outras alterações pouco caracterizadas estejam envolvidas na etiologia da doença. A identificação de pacientes com síndrome hereditária de predisposição ao câncer tem um benefício significativo tanto para o paciente quanto para os parentes em risco.

As síndromes associadas ao CCR são definidas com base nos achados clínicos, patológicos e genéticos. O Quadro 1 apresenta as principais síndromes associadas ao CCR e suas mutações. Dentre elas, a Síndrome de Lynch (SL) é a doença hereditária mais comum e afeta até 3% de todos os pacientes com CCR (FORD 2018).

Quadro 1 – Síndromes hereditárias associadas ao carcinoma colorretal (CCR) e características relacionadas.

Síndrome	Gene	Tumores Associados	Risco de Desenvolver a Doença ao Longo da Vida (%)	Critério Clínico/ Molecular	Herança
Lynch	<i>MLH1</i>	CCR	50-80	Amsterdam I ou Amsterdam II ou Bethesda, Alta Instabilidade de Microsatélite ou Deficiência em alguma proteína MMR (teste imunohistoquímico para expressão de MSH2, MSH6, MLH1 e PMS2)	AD
	<i>MSH2</i>	Endométrio	40-60		
	<i>MSH6</i>	Estômago	11-19		
	<i>PMS2</i>	Ovário	9-12		
	<i>EPCAM</i>	Trato Hepatobiliar	4-5		
		Trato Urinário	4-5		
		Pâncreas	3-4		
		Intestino Delgado	1-4		
		Sistema Nervoso Central	1-3		
Polipose Adenomatosa Familiar	<i>APC</i>	CCR	100	≥ 20 Pólipos Adenomatosos	AD
		Duodeno / Periapilar	4-12		
		Estômago	<1		
		Pâncreas	2		
		Tireoide	1-2		
		Fígado (Hepatoblastoma),	1-2		
		Sistema Nervoso Central (Meduloblastoma)	<1		
Polipose associada ao <i>MUTYH</i>	<i>MUTYH</i>	Cólon	80	≥ 20 e ≤ 100 Pólipos	AR
		Duodeno	4		
Peutz Jeghers	<i>STK11</i>	Mama	54	Pigmentação perioral ou bucal e/ou ≥ 2 pólipos GI (hamartomas) ou história familiar de Síndrome Peutz Jeghers	AD
		CCR	39		
		Pâncreas	11-36		
		Ovário	21		
		Pulmão	15		
		Intestino Delgado	13		
		Cólo de Útero	9		
		Testículo	<1		

Cont/ Quadro 1

Síndrome	Gene	Tumores Associados	Risco de Desenvolver a Doença ao Longo da Vida (%)	Critério Clínico/ Molecular	Herança
Polipose Juvenil	<i>SMAD</i>	CCR	39	Pelo menos 5 pólipos juvenis (hamartomas) no cólon ou em outras partes do trato gastrointestinal ou em indivíduos com história familiar de Polipose Juvenil	AD
	<i>BMPRIA</i>	GI alto (Estômago, Pâncreas e Intestino Delgado)	21		
Polipose associada a <i>polymerase proofreading</i>	<i>POLE</i> <i>POLD1</i>	Endométrio, Adenomas Duodenais	Desconhecido	<p><u><i>POLE</i></u> Polipose Adenomatosa Atenuada (20-100 adenomas), Amsterdam I, CCR e Oligolipolipose (< 50 anos), CCR ou Oligolipolipose e parente de 1º grau com CCR (< 50 anos), CCR ou Oligolipolipose e dois ou mais parentes com CCR ou CE</p> <p><u><i>POLD1</i></u> Polipose Adenomatosa Atenuada (20-100 adenomas), Amsterdam II (apenas CCR e CE), CCR ou CE e Oligolipolipose (< 50 anos), CCR ou CE ou Oligolipolipose e parente de 1º grau com CCR (< 50 ou 60 anos), CCR ou CE ou Oligolipolipose e dois ou mais parentes com CCR ou CE</p>	AD
Síndrome hereditária da Polipose mista	<i>GREM1</i>	CCR	Desconhecido	Pólipos com morfologia mista e variada; Ausência de características extracolônicas	
Deficiência Constitucional nos genes MMR	<i>MLH1</i> <i>MSH2</i> <i>MSH6</i> <i>PMS2</i>	Hematológicos, Cerebrais e Intestino	Desconhecido	Mutações bialélicas nos genes MMR, Manchas café com leite (“café au lait”), Múltiplos pólipos adenomatosos, Predisposição ao câncer infantil	AR
Polipose Autossômica Recessiva	<i>NTHL1</i> <i>MSH3</i>	CCR	Desconhecido	Polipose adenomatosa , CCR ou câncer endometrial	AR

Cont/ Quadro 1

Síndrome	Gene	Tumores Associados	Risco de Desenvolver a Doença ao Longo da Vida (%)	Critério Clínico/ Molecular	Herança
Polipose Serrilhada	Desconhecida	Desconhecido	Desconhecido	<p>≥ 5 Pólipos serrilhados do cólon proximal ao cólon sigmóide, com dois ou mais > 10 mm ou, pólipos serrilhados do cólon croximal ao cólon sigmóide se o indivíduo tiver um parente de primeiro grau com polipose serrilhada ou,</p> <p>> 20 pólipos serrilhados de qualquer tamanho distribuído por todo o cólon</p>	Desconhecida

Legenda: MMR: *mismatch repair*; Oligopolipose: 5-20 adenomas; GI: Gastrointestinal; CE: Câncer de Endométrio; AD: Autossômica Dominante; AR: Autossômica Recessiva. **Fonte:** Adaptado de LV (2017), FORD (2018) e STOFFEL e MURPHY (2019).

1.3.1 Síndrome de Lynch

A síndrome de Lynch é uma doença hereditária com herança autossômica dominante, caracterizada por mutações germinativas em um dos genes envolvidos no processo de reparo a erros de pareamento do DNA (*Mismatch Repair* – MMR), resultando em alto grau de instabilidade de microssatélites (*microsatellite instability* – MSI) e um fenótipo “mutador” (HEIJINK et al. 2011). O fenótipo “mutador” é o resultado de mutações em genes que atuam na manutenção da estabilidade genômica e manifesta-se com o aumento nas taxas de mutações e na evolução genética das células tumorais contribuindo para a progressão do tumor (LOEB 2001). Essas mutações conferem uma vantagem seletiva às células tumorais, promovendo crescimento, invasão e metástase.

As mutações mais frequentes ocorrem nos genes *MLH1* (*mutL homologue 1*), *MSH2* (*mutS homologue 2*), *MSH6* (*mutS homologue 6*) e *PMS2* (*postmeiotic segregation increased 2*) e resultam na perda de função das proteínas codificadas por estes genes (CARETHERS e STOFFEL 2015; LYNCH et al. 2015). Os genes *MLH1* e *MSH2* são responsáveis por 60% e 20%, respectivamente, das mutações germinativas relatadas em pacientes com SL, seguido de 6% em *MSH6* e 12% em *PMS2* (CHEN et al. 2018). A outra cópia do gene afetado em pacientes com uma dessas mutações sofre um segundo evento resultando na falha do sistema MMR e rápida progressão pólipocâncer (FORD 2018).

Uma epimutação a partir da deleção no gene *EPCAM/TACSTD1* foi associada à SL. Epimutação é definida como a repressão transcricional de um gene ativo e ou de um gene geralmente reprimido causado por erros epigenéticos. É portanto uma alteração herdável na atividade do gene que não está associada com mutação no DNA

mas com ganho ou perda da metilação do DNA ou outras modificações herdáveis da cromatina (OEY e WHITELAW 2014). A epimutação envolvendo a deleção em *EPCAM/ TACSTD1* resulta na hipermetilação da região promotora de *MSH2* impedindo a transcrição gênica (RUMILLA et al. 2011; CARETHERS e STOFFEL 2015). Essa epimutação ocorre em menos de 3% dos pacientes com SL e é responsável por aproximadamente 20-25% dos casos nos quais a proteína MSH2 não é detectada por imuno-histoquímica (IHQ) e na ausência de mutações germinativas no gene *MSH2* (RUMILLA et al. 2011; CHEN et al. 2018). Em adição, a metilação como um evento somático na região promotora do outro alelo de *MLH1* ocorre em aproximadamente 16% dos casos de SL (LI et al. 2013).

A inativação de genes MMR aumenta a taxa de mutação durante a síntese de DNA, a qual contribui para o aumento de alterações estruturais que frequentemente ocorre em regiões repetitivas do DNA (PICÓ et al. 2019). Essa característica é conhecida como instabilidade de microssatélites e contribui para o desenvolvimento do CCR hereditário (STRATE e SYNGAL 2005). Indivíduos com essas mutações têm um risco de até 80% de desenvolver CCR ao longo da vida, além de um risco aumentado para outros tumores primários específicos (incluindo endométrio, estômago, ovário, trato hepatobiliar, trato urinário, intestino delgado, pâncreas, sistema nervoso central, mama, entre outros) (LV 2017; FORD 2018).

O diagnóstico clínico de pacientes com SL é baseado nos critérios de Amsterdam I e Amsterdam II. O primeiro considera apenas indivíduos diagnosticados com CCR, com pelo menos três casos na família sendo que um dos pacientes deve ser parente dos outros dois e um deles deve apresentar a doença em idade inferior a 50 anos. Além disso, duas gerações precisam estar afetadas e outras síndromes genéticas

devem ser excluídas (VASEN et al. 1991). O critério de Amsterdam II considera também outros tumores além de CCR, incluindo câncer de endométrio, pâncreas, estômago, tumores de vias biliares, tumores de pelve renal ou uroteliais, dentre outros (VASEN et al. 1999). Mais de 50% das famílias com SL não se enquadram nos critérios definidos acima, portanto os critérios de Bethesda foram desenvolvidos com o intuito de identificar esses casos (UMAR et al. 2004; BOLLAND e SHIKE 2010). No Quadro 2 é possível visualizar detalhadamente cada um destes critérios.

Quadro 2 – Critérios internacionais utilizados para o diagnóstico clínico de pacientes com Síndrome de Lynch denominados Amsterdam e Bethesda. Os pacientes devem apresentar pelo menos três das características descritas pelos critérios de Amsterdam I ou II, ou uma das características listadas no critério de Bethesda.

Amsterdam I
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Confirmação histológica de CCR em três ou mais parentes (um destes devendo ser parente de primeiro grau dos outros dois); ▪ Presença da doença em pelo menos duas gerações sucessivas; ▪ Idade de apresentação da doença inferior a 50 anos em um dos parentes; ▪ Exclusão de síndromes com polipose.
Amsterdam II
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Critérios de Amsterdam I; ▪ Tumores do espectro da SL histologicamente confirmados: CCR, cerebral (geralmente glioblastoma), endométrio, gástrico, intestino delgado, mama, pâncreas, pele (adenomas e carcinomas sebáceos), próstata, trato biliar, ovário, ureter e pélvis renal.
Bethesda
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Indivíduos com idade inferior a 50 anos diagnosticados com CCR; ▪ CCR sincrônico* e/ou metacrônico**, CCR ou outros tumores associados a SL em qualquer idade; ▪ CCR com características patológicas associadas à instabilidade de microsatélites (reação linfocítica <i>Crohn-like</i>, diferenciação celular mucinosa ou em anel de sinete ou padrão de crescimento medular) antes dos 60 anos de idade; ▪ Pelo menos um parente de 1º grau diagnosticado com CCR e/ou tumores relacionados à SL antes dos 50 anos de idade; ▪ Dois parentes de 1º ou 2º grau com tumores relacionados à SL independente da idade.

Fonte: Adaptado de VASEN et al. (1991), VASEN et al. (1999), UMAR et al. (2004) e YURGELUN e HAMPEL (2018).

Legenda: CCR: Câncer Colorretal; SL: Síndrome de Lynch. * dois tumores ao mesmo tempo ou seu aparecimento em menos de seis meses; ** novo câncer após seis meses.

Os critérios clínicos são bastante importantes quando há suspeita da síndrome, no entanto, o diagnóstico inicial universalmente utilizado é análise da expressão de proteínas do sistema MMR por IHQ, as quais apresentam expressão diminuída quando há mutação ou metilação em algum destes genes. Alternativamente, pode ser realizada a análise de MSI (instabilidade de microssatélites) que resulta da deficiência de MMR e é detectada como alterações no comprimento dos elementos repetitivos de DNA no tecido tumoral causado pela inserção ou deleção de unidades repetidas (HENDRIKS et al. 2006; SEPULVEDA et al. 2017; GIARDIELLO et al. 2014). Embora estes testes iniciais sejam comuns na prática clínica, devido ao custo-benefício, a identificação de uma mutação germinativa em genes MMR por sequenciamento ou deleção em *EPCAM* é definitivo para o diagnóstico da síndrome de Lynch (JASPERSON et al. 2010; GIARDIELLO et al. 2014; SEPULVEDA et al. 2017).

Aproximadamente 60% das famílias que preenchem os critérios de Amsterdam apresentam mutações germinativas ou epimutação em genes MMR (LINDOR et al. 2005; LYNCH et al. 2009). No entanto, alguns casos de CCR que preenchem os critérios de Amsterdam apresentam defeitos funcionais em genes MMR identificados por IHQ e/ou pela presença de MSI. Embora estes pacientes não possuam alteração germinativa conhecida são considerados portadores da Síndrome de Lynch-like (SLL) (PICÓ et al. 2019). Casos que preenchem os critérios de Amsterdam para o diagnóstico de SL, com tumores apresentando microssatélites estáveis e sem mutações germinativas nos genes MMR, foram descritos como portadores do câncer colorretal familiar do tipo X (CCFTX) (LINDOR et al. 2005; LYNCH et al. 2009; LYNCH et al. 2015; CHEN et al. 2018).

Aproximadamente 80% dos tumores colorretais diagnosticados em pacientes jovens são proficientes em MMR e ainda não é bem definida a prevalência de alterações genéticas de risco nesses pacientes (GIRÁLDEZ et al. 2010; MORK et al. 2015). Recentemente, foi reportado que cerca de 17% a 35% dos pacientes jovens com CCR apresentam variantes patogênicas germinativas e metade estão em genes MMR associados à síndrome de Lynch (STOFFEL e MURPHY 2019). Esses dados reforçam a importância de investigar e compreender a base molecular destes tumores em pacientes jovens.

A identificação de marcadores moleculares em pacientes potencialmente portadores de algum componente hereditário pode ser bastante útil no reconhecimento de indivíduos com risco de desenvolver neoplasias, bem como para auxiliar o delineamento de estratégias de vigilância e prevenção do câncer, além de contribuir para a decisão terapêutica (DOMINGUEZ-VALENTIN et al. 2015).

1.4 MECANISMOS DE REPARO A DANOS NO DNA

Uma das principais características do câncer é a instabilidade genômica (HANAHAN e WEINBERG 2011). Entretanto, as células possuem diversos mecanismos interligados capazes de manter a integridade genômica conhecidos como mecanismos de “respostas a danos do DNA” (*DNA damage response – DDR*) (CICCIA e ELLEDGE 2010).

Os mecanismos envolvidos na resposta a danos do DNA podem ser divididos pelo tipo de lesão. No entanto, a maioria das vias DDR segue os mesmos passos de maneira coordenada: ocorre o reconhecimento do dano no DNA, o qual promove o

acúmulo de diversos fatores de reparo no local lesionado e, subsequentemente, a lesão é reparada (LORD e ASHWORTH 2012). Entre os mecanismos que permitem a manutenção da integridade do genoma estão aqueles que envolvem as proteínas de remodelação da cromatina, as quais permitem que o mecanismo de reparo tenha acesso ao DNA danificado (BELL et al. 2011). Também participam os componentes de *checkpoint* do ciclo celular e a maquinaria de segregação cromossômica (LORD e ADHWORTH 2012). Essas interações permitem que o reparo do DNA ocorra antes da mitose ser iniciada garantindo que as células filhas tenham o complemento correto do material genético.

Os defeitos específicos de DDR não são conhecidos na maioria dos tumores; no entanto, existem vários exemplos nos quais há uma relação entre a disfunção de algum mecanismo específico de DDR e o fenótipo neoplásico (LORD e ARSHWOTH 2012). Embora defeitos na via de MMR associados ao risco de CCR sejam bem descritos em literatura (LYNCH et al. 2015; CHEN et al. 2018), é menos conhecido o papel de outras vias canônicas de reparo ao DNA. Nos últimos anos, alguns estudos reportaram mutações germinativas na via de reparo por recombinação homóloga (*homologous recombination* – HR) em pacientes com CCR, o que denota a importância de estudar outras vias de reparo disfuncionais associadas a este tipo de tumor (YURGELUN 2015; PEARLMAN et al. 2017).

1.4.1 Reparo a Erros de Pareamento (*Mismatch Repair* – MMR)

A via MMR é fundamental para a manutenção da fidelidade genômica corrigindo erros de pareamento de base única e pequenas inserções ou deleções

causadas pela DNA polimerase durante a replicação do DNA (LYNCH et al. 2015; ABEDALTHAGAFI 2018).

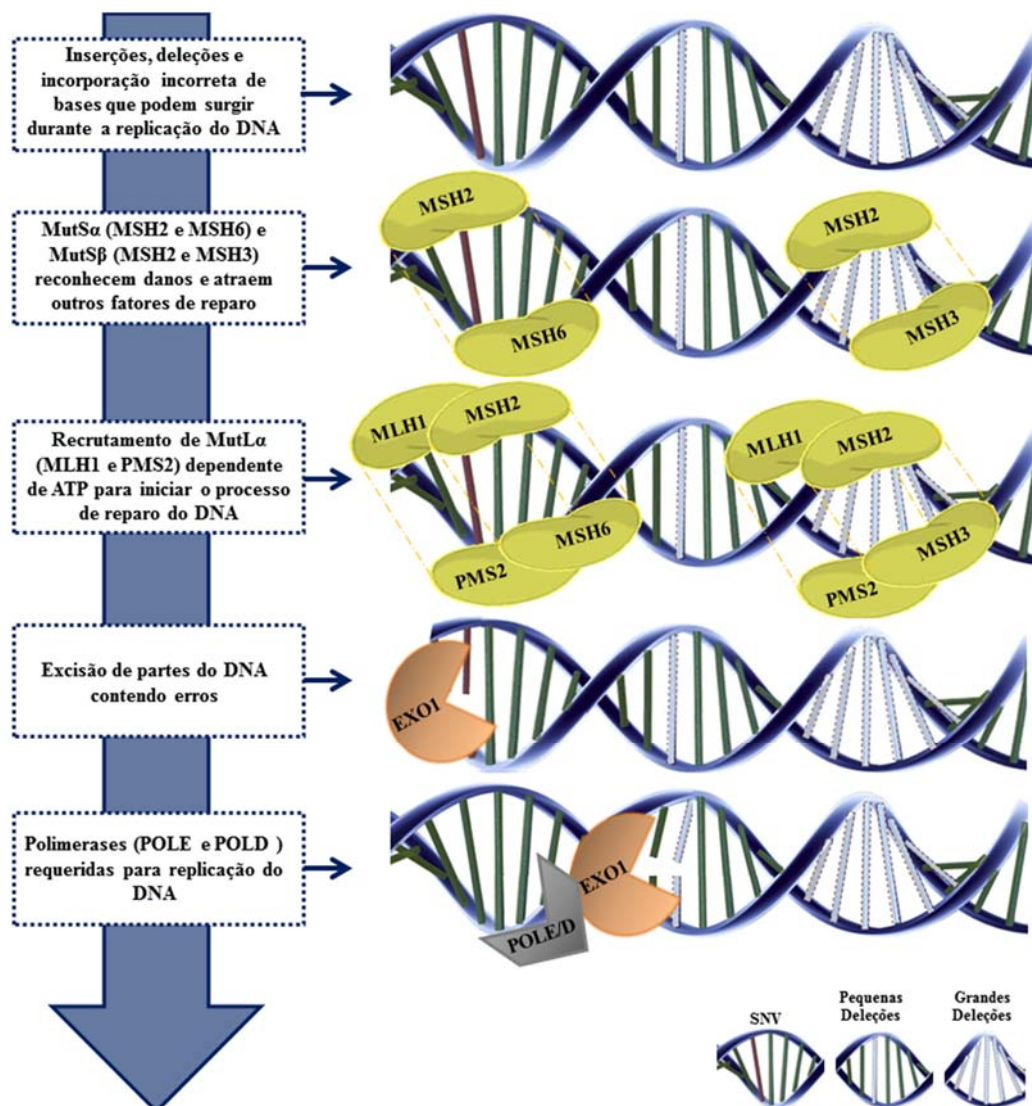
O sistema MMR é constituído principalmente pelos complexos proteicos envolvendo MSH1, MSH2, MSH6 e PMS2. Outros elementos da maquinaria incluem *exonuclease 1* (EXO1) e polimerases capazes de revisar a atividade de reparo tais como as polimerases ϵ e δ (POLE e POLD, respectivamente) (Figura 1).

A perda da atividade do sistema MMR, devido à falta de função de qualquer uma dessas proteínas está associada com o desenvolvimento de tumores e MSI (GERMANO et al. 2018). Tumores deficientes em MMR acumulam um grande número de mutações *frameshifts* e SNV (*single-nucleotide variants*) e são, portanto, caracterizados por alta taxa mutacional (TURAJLIC et al. 2017). Análises de exoma revelaram alta prevalência de instabilidade de microssatélites em tumores de endométrio (30%), gástricos (20%), colon (~19%) e reto (~5%), e baixas proporções em outros tipos tumorais (HAUSE et al. 2016; CORTES-CIRIANO et al. 2017).

A presença de apenas um alelo inativado na linhagem germinativa em genes MMR está associada com a Síndrome de Lynch. Raramente ocorre deficiência constitucional causada por inativação bialélica dos genes MMR (GERMANO et al. 2018). A deficiência constitucional dos genes MMR também foi relatada como associada ao aumento na incidência de neoplasias linfoproliferativas e cânceres infantis (JONGMANS et al. 2016).

Tumores com deficiência no sistema MMR geralmente apresentam um prognóstico favorável em relação a tumores proficientes em MMR, no entanto tumores com MSI também podem progredir para metástases e os pacientes podem responder mal a quimioterapia (SARIDAKI et al. 2014; SARGENT et al. 2010; FUJIYOSHI et

al. 2017). O status MMR/MSI é considerado um marcador prognóstico para o CaRe, com taxa de sobrevivência em 5 anos de 100% para tumores com deficiência de MMR em estádios I/II (DE ROSA et al. 2016).



Fonte: Esquema baseado em GERMANO et al. (2018).

Figura 1 - Mecanismo molecular do sistema de *mismatch repair* (MMR). Este mecanismo garante a replicação do DNA livre de erros de pareamento por meio da atividade de complexos multiproteicos: MutS α (MSH2 e MSH6) e MutL α (MLH1 e PMS2) que reconhecem erros de pareamento base-base e pequenas inserções/deleções; e MutS β (MSH2 e MSH3) e MutL α que reconhecem grandes inserções e deleções; EXO1 cataliza a excisão quando há erros; POLE e POLD permitem que ocorra a síntese de DNA livre de erros após a excisão de nucleotídeos.

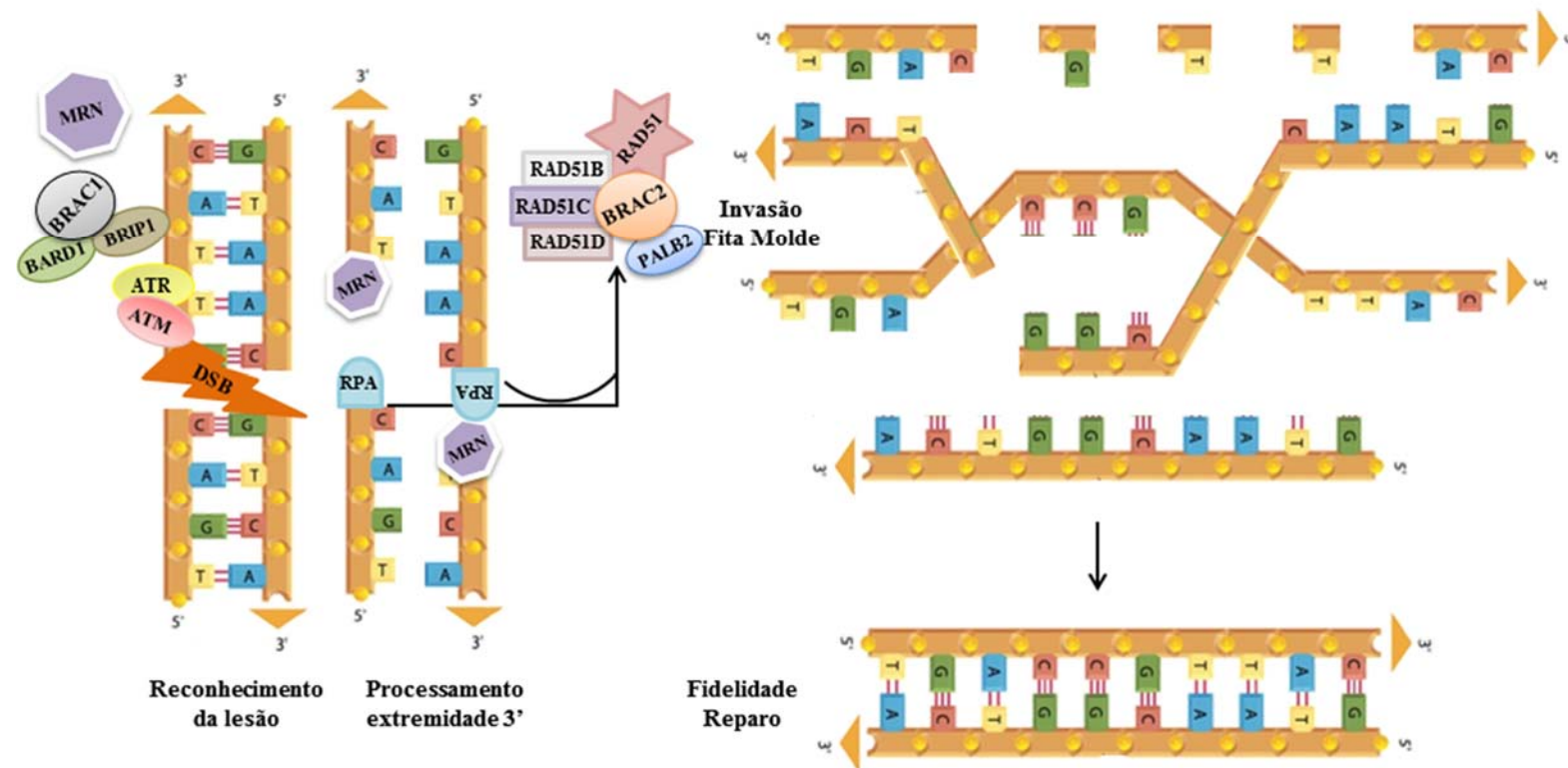
1.4.2 Recombinação homóloga (*Homologous recombination - HR*)

Dentre as alterações genômicas mais comuns, as quebras de fita dupla do DNA (*double strand breaks – DSBs*) são consideradas as lesões mais nocivas e citotóxicas à célula, pois podem levar a grandes rearranjos cromossômicos e erros de segregação (SUNG e KLEIN 2006). A recombinação homóloga (*homologous recombination – HR*) é uma das vias de reparo a quebras da fita dupla do DNA. Essa via ocorre durante a fase S-G2 do ciclo celular, e é capaz de reparar, com fidelidade, quebras de fita dupla a partir de um molde, ou seja, quando uma cromátide irmã intacta pode servir como modelo para o reparo, processo fundamental na manutenção da fidelidade da replicação (ROY et al. 2011).

A recombinação homóloga é fundamental na troca de informação genética entre sequências alélicas e tem um papel essencial tanto na meiose quanto na mitose (LOK e POWELL 2012). Na meiose, a recombinação homóloga permite a troca de material genético entre os alelos paterno e materno contribuindo para a variabilidade genética. Além disso, a HR coordena a segregação adequada dos pares de cromossomos homólogos durante a primeira divisão meiótica. Na mitose, a recombinação mantém a integridade genômica, promovendo o reparo preciso da quebra de dupla fita do DNA (LOK e POWELL 2012).

Como representado na Figura 2, no processo de reparo pela via HR a quebra de fita dupla de DNA é reconhecida por ATM e ATR, quinases que fosforilam alvos específicos como CHEK2, TP53, BRCA1 e H2AX. A fosforilação da histona γ H2AX por ATM, bem como de outros substratos (MDC1, NBS1, P53 e CHK2), é necessária para a montagem do complexo de resposta a danos ao DNA (mediador-MRN-ATM) nos locais danificados. As proteínas envolvidas no controle do ciclo celular são

ativadas e levam a parada do ciclo celular. O complexo BRCA1, BARD1 e BRIP1, atua na organização das proteínas até o local de reparo. O complexo de proteínas MRN (MRE11, RAD50 e NBS1) remove a extremidade 3' da molécula de DNA para gerar filamentos de fita simples. A proteína RPA é capaz de interagir com esses filamentos, conservando sua conformação de fita simples. Em seguida, BRCA2 é recrutada com o auxílio de PALB2 e juntamente com RAD51B, RAD51C e RAD51D transloca o RAD51 para a fita simples de DNA revestido por RPA. O filamento da nucleoproteína RAD51 invade a fita de DNA homóloga em um processo chamado invasão de fita, permitindo que o reparo do DNA ocorra com o uso da cromátide-irmã como modelo para reparo de alta fidelidade (WALSH 2015). A DNA-polimerase adiciona nucleotídeos na região 3' terminal da fita danificada, com base nas informações da fita molde (Figura 2).



Fonte: Esquema baseado em WALSH (2015).

Figura 2 - Mecanismo molecular do sistema de recombinação homóloga (HR). O sistema HR permite o reparo a quebra de fita dupla do DNA. ATM e ATR reconhecem a lesão e recruta o mecanismo de reparo. O complexo MRN remove a extremidade 3' para a geração da fita única de DNA. A proteína RPA reveste a fita simples de DNA e BRCA2 com o auxílio de PALB2 é ativado e juntamente com as proteínas RAD51B, RAD51C e RAD51D realiza a transferência da fita de DNA para a proteína RAD51. Ocorre então a invasão da fita molde e reparo da molécula de DNA.

Grandes rearranjos genômicos, como deleções, inserções e translocações que são altamente genotóxicos, são consequência de defeitos no reparo de quebras de fita dupla do DNA e estão positivamente correlacionados com a progressão do câncer (APARICIO et al. 2014).

Mutações germinativas em *BRCA1* e *BRCA2* são responsáveis por aproximadamente 5-10% dos cânceres de mama e 10-18% dos cânceres de ovário (ALSOP et al. 2012). Em adição, os genes *ATM*, *CHEK2*, *BARD1*, *BRIP1*, *MRE11*, *RAD50*, *NBS1*, *RAD51C*, *RAD51D* e *PALB2* da via HR já foram associados ao risco de câncer hereditário, especialmente mama e ovário (WALSH 2015). Neste último estudo, foi observado que 30% dos pacientes com mutação em genes da via de recombinação homóloga não tinham história familiar de câncer de mama ou de ovário. As formas familiares de câncer de mama, ovário e pâncreas estão associadas a mutações de perda de função em genes associados à via de recombinação homóloga, como *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*, *ATM*, *RAD51C* e *RAD51D* (LORD e ARSHWOTH 2012). Os pacientes com mutações germinativas em *BRCA1* e *BRCA2*, e também apresentam aumento de risco para o câncer de próstata e estômago (CAVANAGH e ROGERS 2015). Interessantemente, um estudo mostrou que o risco de câncer de próstata associado a mutações fundadoras em *BRCA1* e *BRCA2* foi maior em homens que não relataram história familiar (primeiro grau) de câncer de próstata, mama ou ovário (AGALLIU et al. 2009). Recentemente, um estudo identificou mutações germinativas em *ATM*, *BRCA1*, *BRCA2* e *PALB2* em pacientes com câncer colorretal, e apontou *ATM* e *PALB2* como genes de predisposição ao CCR (ALDUBAYAN et al. 2018).

1.5 ALTERAÇÕES GENÔMICAS EM PACIENTES COM CÂNCER COLORRETAL HEREDITÁRIO

Devido à base genética não esclarecida em pacientes com CCR familiar negativos para mutações nos genes MMR, alguns estudos reportam novas alterações moleculares como possivelmente associadas com o risco de desenvolvimento destes tumores.

GOEL et al. (2010) avaliaram por pirosequenciamento os níveis de metilação em *LINE-1* (*long interspersed element-1*), um marcador de metilação global, em tumores de pacientes com CCR hereditário negativos para alterações em genes MMR com microssatélite estável e também em outros tipos de CCR (esporádico com microssatélite instável, esporádico com microssatélite estável e síndrome de Lynch). A análise revelou hipometilação em *LINE-1* em tumores hereditários com microssatélite estável quando comparado à pacientes com SL ou aqueles com CCR esporádico, inferindo instabilidade cromossômica nesses tumores hereditários (GOEL et al. 2010). Este achado levou a sugestão de que carcinomas caracterizados pela hipometilação de *LINE-1* constituem um subtipo de câncer colorretal distinto com pior prognóstico (OGINO et al. 2008; GOEL et al. 2010; BABA et al. 2010; AHN et al. 2011). Também foi observado que pacientes jovens apresentam mais frequentemente hipometilação em *LINE-1* (ANTELO et al 2012).

Variações no número de cópias genômicas (CNV – *copy number variations*) também foram associadas ao risco de câncer colorretal. VENKATACHALAM et al. (2011) avaliaram o perfil global de CNVs de 41 pacientes jovens (<40 anos) com CCR hereditário e microssatélite estável. Os autores identificaram novas CNVs em seis

pacientes abrangendo, dentre outros, os genes *CDH18*, *GREM1* e *BCR* e duas deleções envolvendo hsa-mir-491 e hsa-mir-646. Em 30 casos de câncer colorretal familiar negativos para mutações nos genes MMR, MIDDELDORP et al. (2012) relataram múltiplas alterações genômicas envolvendo diferentes cromossomos. Os autores destacaram uma alta frequência de ganhos em 20q (77%) nos casos familiares quando comparado aos casos esporádicos. Os dados obtidos sugeriram também uma associação entre esta alteração e a progressão tumoral (MIDDELDORP et al. 2012).

Um estudo prévio do nosso grupo avaliou CNVs em 45 pacientes classificados pelos critérios de Amsterdam I/II (oito casos) ou Bethesda (37 casos) negativos para mutações nos genes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS1*, *PMS2*, *CHEK2* e *TP53* (VILLACIS et al. 2016). Foram identificadas 35 CNVs raras abrangendo 67 genes conhecidos em 22 pacientes, dentre as principais alterações destacaram-se os ganhos em *GALNT6* e *GALNT11* e perda em *SEMA3C*. Nesse estudo também foram avaliados 10 polimorfismos de base única (*single nucleotide polymorphism – SNPs*), descritos previamente como associados com o risco de desenvolvimento do CCR. Embora não significativo, foi observado um aumento de alelos de risco nos pacientes quando comparados a um grupo controle composto por 100 indivíduos saudáveis. Em conjunto, os dados sugeriram que alterações genômicas e SNPs de risco podem contribuir para a predisposição ao desenvolvimento de câncer nestes indivíduos e famílias (VILLACIS et al. 2016).

1.6 SEQUENCIAMENTO DE ALTO DESEMPENHO EM PACIENTES COM HISTÓRIA FAMILIAL DE CCR

O sequenciamento de alto desempenho (*Next-Generation Sequencing* – NGS) tem se mostrado uma tecnologia promissora tanto do ponto de vista técnico como em relação ao custo-benefício (GALLEGO et al. 2015). É considerado um método de alto rendimento, pois consiste no sequenciamento simultâneo de múltiplas regiões genômicas em diversas amostras ao mesmo tempo (SERRATÌ et al. 2016).

Desde 2005, diversas plataformas de sequenciamento de alto rendimento foram desenvolvidas (PILLAI et al. 2017). Cada tecnologia possui uma estratégia diferente, mas é possível resumir o processo de sequenciamento em três etapas em comum: preparo da amostra, amplificação da biblioteca e sequenciamento do DNA (METZKER 2010). O DNA é fragmentado aleatoriamente para que todo o genoma seja coberto de forma uniforme. Os moldes ou *templates*, podem ser produzidos por processos químicos, mecânicos ou enzimáticos. Em seguida, são incorporados adaptadores (sequências artificiais conhecidas) ao *template* os quais permitem combinar diferentes amostras em uma mesma reação de sequenciamento. São produzidas milhares de cópias de cada fragmento de DNA pelo processo de amplificação, aumentando assim a fonte de sinal luminoso, o qual é capturado na maioria dos sequenciadores. Uma série de reações químicas que gera sinais capazes de serem detectados determinam a sequência de bases de cada *template* durante o sequenciamento (METZKER et al. 2010).

Os dados brutos gerados são armazenados na forma de *reads* de sequenciamento, as quais contém as informações sobre um fragmento de DNA e um

vetor de probabilidade de erro para cada base (DESVILLECHABROL et al. 2016). O tamanho das *reads* pode variar de 35 a 700 bases para abordagens de leituras curtas (*short-reads*) a milhares de bases para tecnologias de leitura longa (*long-reads*) (EID et al. 2009; EISENSTEIN 2012; GOODWIN et al. 2016). As *reads* geradas são alinhadas ao genoma de referência e a cobertura do genoma é definida pelo número de *reads* mapeados em uma posição específica (DESVILLECHABROL et al. 2016). Existem alguns desafios relacionados a abordagem de alinhamento, como *reads* em regiões repetitivas no genoma de referência ou em regiões correspondentes que podem não existir no genoma de referência e, conseqüentemente, resultam em lacunas no genoma de referência ou na identificação de variantes estruturais do genoma analisado (METZKER 2010). O número de vezes que um determinado nucleotídeo no genoma é lido determina a precisão para remontagem das *reads* contíguas e melhora a força estatística associada à sequência correta (DESVILLECHABROL et al. 2016). A cobertura do sequenciamento permite avaliar a qualidade do mapeamento e a identificação de alterações com maior segurança (DESVILLECHABROL et al. 2016).

A tecnologia NGS para a análise de DNA resulta na identificação de mutações em ponto, pequenas inserções ou deleções, alterações no número de cópias e rearranjos (SHYR e LIU 2013). Para analisar e interpretar a quantidade de dados gerados pelo sequenciamento, diversos modelos estatísticos e ferramentas de bioinformática têm sido desenvolvidos (MAGI et al. 2010; LEE et al. 2012). Em geral, a análise de sequenciamento de genomas inclui o alinhamento das *reads*, detecção das variantes e a predição funcional (SHYR e LIU 2013).

Em relação a alterações germinativas, a tecnologia NGS tem como principais aplicações o sequenciamento de exoma completo (*whole-exome sequencing* – WES) e

o sequenciamento de genes-alvo (*target* NGS – tNGS). Ambas as estratégias são usadas para identificar alterações em regiões codificadoras (éxons) as quais podem determinar um fenótipo (METZKER et al. 2010; SERRATÍ et al. 2016). Os éxons são regiões codificadoras que representam aproximadamente 2,5% do genoma humano, onde ocorrem cerca de 85% das variantes relacionadas às doenças conhecidas (MAJEWSKI et al. 2010; SERRATÍ et al. 2016). Embora o sequenciamento de exoma tenha contribuído para a descoberta de novos genes relacionados ao fenótipo, a quantidade de dados gerados é grande e o procedimento é laborioso e dispendioso comparado ao tNGS. O sequenciamento de genes-alvo não é a estratégia ideal para identificar novos genes, mas é uma abordagem interessante para investigar múltiplos genes relacionados a um fenótipo, requer menor quantidade de DNA e a pesquisa pode ser feita de forma mais específica gerando dados gerenciáveis, os quais facilitam a análise (GALLEGO et al. 2015). Em adição, o tNGS é mais preciso e acessível em termos de tempo e custo para aplicações clínicas (SERRATÍ et al. 2016).

Nos últimos anos diversos estudos surgiram utilizando a tecnologia NGS para caracterizar molecularmente diversos tipos tumorais afim de identificar novas alterações genéticas relacionadas à oncogênese, progressão e metástase assim como para estudar a complexidade, heterogeneidade e evolução do tumor (PEARLMAN et al. 2017; DERYCKE et al. 2017; KAYSER et al. 2018; MARTIN-MORALES et al. 2018). Além disso, diversos achados têm sido reportados em CCR usando o sequenciamento de alto desempenho. O Quadro 3 resume os principais estudos que utilizaram NGS em carcinomas colorretais familiares.

Quadro 3 - Dados em literatura utilizando a metodologia NGS para CCR familiar.

Referência	Amostras avaliadas	Principais resultados
GYLFE et al. 2013	SP ou tecido de cólon normal e tecido tumoral de 96 pacientes com CCR familiar (MSI/MSS)	422 variantes <i>frameshift</i> , 115 variantes <i>nonsense</i> e 51 variantes em sítios de <i>splicing</i> em pelo menos dois casos, 11 genes (>2 casos CCR) validados: <i>UACA</i> , <i>SFXN4</i> , <i>TWSG1</i> , <i>PSPH</i> , <i>NUDT7</i> , <i>ZNF490</i> , <i>PRSS37</i> , <i>CCDC18</i> , <i>PRADCI</i> , <i>MRPL3</i> e <i>AKRIC4</i> .
DERYCKE et al. 2013	SP de 40 pacientes com CCR familiar (16 famílias)	32 SNV <i>nonsense</i> ou <i>splice-site</i> , 375 SNV <i>missense</i> , 1394 SNV não codificadoras ou sinônimas e 50 deleções. Dois genes validados: <i>CENPE</i> e <i>KIF23</i> .
NIEMINEN et al. 2014	SP 4 pacientes (irmãos) com CCR de 1 família	8 deleções e 22 SNV. Mutação no gene <i>RPS20</i> validado em outros membros da família com DNA de sangue disponível e ausente em indivíduos saudáveis.
SCHULZ et al. 2014	SP de 4 membros de um família com história de CCR familiar	Três variantes germinativas no gene <i>SEMA4A</i> .
ESTEBAN-JURADO et al. 2015	SP de 43 pacientes de 29 famílias com história de CCR	Alterações potencialmente deletérias em 10 genes previamente relatados na predisposição ao CCR : <i>AKRIC4</i> , <i>BMPRIA</i> , <i>CCDC18</i> , <i>MYC</i> , <i>POLE</i> , <i>BMP4</i> , <i>DUSP4</i> , <i>LAMA5</i> , <i>ENG</i> e <i>ATM</i> . Os genes <i>CDKN1B</i> , <i>XRCC4</i> , <i>EPHX1</i> , <i>NFKBIZ</i> , <i>SMARCA4</i> e <i>BARD1</i> foram considerados candidatos potenciais a predisposição de CCR.
SEGUÍ et al. 2015	SP de 3 membros de uma família com história de CCR familiar	32 variantes não sinônimas novas ou raras. Variantes <i>nonsense</i> no gene <i>FANI</i> validada em outras famílias com os mesmos critérios.
KINNERSLEY et al. 2016*	SP de 6.856 casos de CCR e 10.090 controles	Nenhuma diferença significativa das variantes c.1451G>C e c.2044C>A no gene <i>SEMA4A</i> entre indivíduos com CCR e saudáveis.
BRODERICK et al. 2017	SP de 863 casos de CCR familiar e 1.604 controles	Variantes p.Gln90Ter / p.Gln287Ter no gene <i>NTHL1</i> em um paciente com CCR. Três variantes em <i>RPS20</i> (p.Val50SerfsTer23, p.Leu61GlufsTer11 e p.Val54Leu) em pacientes com CCR.
KAYSER et al. 2018	SP de 39 pacientes com CCR que preencheram os critérios de Amsteda ou Bethesda	98 variantes raras (frequência alélica <0.005), das quais 16 foram encontradas em genes bem estabelecidos ao risco de CCR. Foram identificadas variantes associadas ao CCR nos genes <i>CHEK2</i> , <i>APC</i> , <i>POLE</i> , <i>POLD1</i> , <i>MSH2</i> e <i>MSH6</i> .
FIEVET et al. (2019)	SP de 436 pacientes com suspeita de predisposição genética ao CCR	Duas variantes patogênicas em <i>FANI</i> (c.959del e c.2616del) em pacientes com suspeita de predisposição ao CCR (um paciente com múltiplos pólipos hamartomatosos e outro com câncer de endométrio). No entanto, essa variantes não demonstraram desenvolver papel importante em casos com suspeita de predisposição genética para pólipos e CCR.

Legenda: SP: sangue periférico; CCR: câncer colorretal; MSI: *microsatellite instability*; MSS: *microsatellite stable*; *Frameshift*: mutação que altera o módulo de leitura; *Nonsense*: sem sentido; *Missense*: sentido trocado; *Splice-site*: sítio de *splicing* (onde ocorre a remoção de introns para posterior junção dos éxons); SNV: *single nucleotide variation*. * Este estudo utilizou um enriquecimento de casos que tinham história familiar de CCR e/ou em idade jovem.

NIEMINEN et al. (2014) identificaram uma mutação truncada no gene *RPS20* (p.Val50SerfsX23), que codifica um componente da subunidade menor do ribossomo, em quatro indivíduos de uma mesma família classificada com câncer colorretal familiar do tipo X (NIEMINEN et al. 2014). Ao avaliar o sequenciamento de exoma completo de 863 CCR familiar e 1604 controles (sem câncer), BRODERICK et al. (2017) encontraram duas variantes com potencial patogênico (p.Leu61GlufsTer11 e p.Val54Leu) em *RPS20* em dois indivíduos com CCR familiar e não detectaram nenhuma variante neste gene em indivíduos saudáveis. Segundo os autores o gene *RPS20* e seu papel no risco de CCR ainda precisa ser melhor estudado, uma vez que variantes com potencial patogênico neste gene foram identificadas em poucos indivíduos e o mecanismo pelo qual as proteínas ribossômicas podem predispor ao CCR não é ainda estabelecido.

SCHULZ et al. (2014) relataram três variantes (p.Val78Met, p.Gly484Ala e p.Ser326Phe) e um SNP (p.Pro682Ser) no gene *SEMA4A* em pacientes com CCFTX. Uma análise funcional com a variante *SEMA4A* (p.Val78Met) revelou que o alelo mutado aumenta significativamente a sinalização das vias MAPK/Erk e PI3K/Akt conferindo maior capacidade de proliferação celular (SCHULZ et al. 2014). Os autores concluíram que alterações em *SEMA4A* conferem um risco aumentado para o desenvolvimento de CCR. Entretanto, KINNERSLEY et al. (2016) ao investigar duas variantes em *SEMA4A* (p.Gly484Ala e p.Pro682Ser) em 6.856 casos de CCR e 10.090 controles não encontraram nenhuma diferença significativa entre os grupos, confrontando os achados de SCHULZ et al. (2014) e sugerindo que este não deve ser um gene de predisposição associado ao CCR.

Uma mutação patogênica *nonsense* no gene *FANI* foi identificada em tumores sem alterações nos genes MMR de três indivíduos com CCR pertencentes a uma família classificada pelos critérios de Amsterdam (SEGUÍ et al. 2015). Entre estes indivíduos foram identificadas 32 variantes, incluindo *FANI*. Diante deste achado, os autores avaliaram 176 famílias categorizadas pelos critérios de Amsterdam e identificaram outras quatro variantes genéticas raras no gene *FANI*. Os achados foram confirmados em 15 membros destas famílias (10 com CCR, um com câncer de mama e três indivíduos não afetados por câncer). Os dados sugeriram o envolvimento do gene *FANI* no risco de desenvolvimento ao CCR em famílias sem alterações nos genes MMR categorizadas pelos critérios de Amsterdam (SEGUÍ et al. 2015). Apesar destes dados, BRODERICK et al. (2017) consideraram que a contribuição de *FANI* no CCR hereditário era duvidosa, uma vez que usando cinco famílias avaliadas por SEGUI et al. (2015) observaram uma fraca co-segregação das variantes ($P = 0.125$) e não foi observada perda de heterozigose ou mutação somática nos tumores dos cinco indivíduos com mutação em *FANI*. Além disso, os autores realizaram o sequenciamento de exoma completo em 863 CCR familiar e 1604 controles (sem câncer) e não encontraram aumento significativo de variantes em *FANI* em casos comparados aos controles (BRODERICK et al. 2017). Ao investigar 5136 pacientes com suspeita clínica a predisposição hereditária de CCR, câncer de mama/ ovário e outros tumores, utilizando a técnica de sequenciamento alvo para 56 genes, FIEVET et al. (2019) identificaram 15 variantes (sem sentido e deleções que alteram o quadro de leitura) em *FANI* em 18 indivíduos. No entanto, os dois pacientes com suspeita para CCR com variantes em *FANI* apresentaram vários pólipos hamartomatosos e câncer endometrial, respectivamente, e nenhum CCR foi reportado em parentes de

primeiro ou segundo graus dos demais 16 casos com suspeita para câncer de mama/ovário e outros tumores (FIEVET et al. 2019). Os autores reforçaram que o gene *FANL* não deve ser incluído no painel de genes para testes em pacientes com uma suspeita clínica de predisposição genética para pólipos e tumores colorretais (FIEVET et al. 2019).

GYLFE et al. (2013) sequenciaram o exoma de 96 amostras de pacientes com história de CCR familiar sem mutações nos genes *MLH1* e *MSH2* e detectaram 588 variantes (422 que alteram o módulo de leitura, 115 sem sentido e 51 sítios de *splicing*) presentes em pelo menos duas amostras. Os autores confirmaram alterações em 23 variantes (sete que alteram o módulo de leitura, 12 sem sentido e quatro em sítios de *splicing*) e concluíram que alterações em 11 genes (*UACA*, *SFXN4*, *TWSG1*, *PSPH*, *NUDT7*, *ZNF490*, *PRSS37*, *CCDC18*, *PRADCI*, *MRPL3* e *AKR1C4*) tem potencial para estarem associados à predisposição ao CCR. Além disso, a análise de perda de heterozigose (*loss of heterozygosity* – LOH) revelou a deleção do alelo normal nos genes *UACA*, *TWSG1*, *PSPH* e *ZNF490* em pelo menos um caso (GYLFE et al. 2013), reforçando o potencial destes genes como fatores de predisposição. Concordante aos achados de GYLFE et al. (2013), duas variantes (c.178C>T e c.272G>A) em *NUDT7* foram identificadas em três pacientes com CCR familiar. A variante c.272G>A (p.Arg91Gln) está localizada em um sítio ativo da proteína, sugerindo um papel importante no risco de desenvolvimento ao CCR (HANSEN et al. 2017). O gene *CCDC18* foi subsequentemente reportado como associado a predisposição ao CCR familiar por ESTEBAN-JURADO et al. (2015) e HANSEN et al. (2017). No entanto, um número limitado de indivíduos apresentaram variantes nesses genes e não foram realizadas análises de segregação. Outro estudo similar avaliando 40 pacientes de 16

famílias com CCR familiar sem evidência para SL, PAF ou mutações em *MUTYH* identificou 3245 variantes exônicas (DERYCKE et al. 2013). Vinte e sete destas variantes foram validadas por Sanger e demonstraram segregar com a doença. Duas variantes raras em *CENPE* (não reportada em bancos de dados) e *KIF2* (reportada apenas uma vez pelo banco de dados ESP) foram também detectadas (DERYCKE et al. 2013).

O sequenciamento de exoma foi avaliado em amostras de 43 pacientes com CCR pertencentes a 29 famílias sem alterações nos genes *MMR*, *APC* e *MUTYH* (ESTEBAN-JURADO et al. 2015). Os autores identificaram 424 variantes raras (125 que alteram o módulo de leitura, em sítios de *splicing* ou sem sentido e 299 com sentido trocado), com uma média de 6 a 36 variantes por família. Destas, 28 variantes foram selecionadas de acordo com funções/interações proteicas e descritas em genes envolvidos no CCR familiar para serem melhor investigadas. As variantes dos genes *CDKN1B*, *XRCC4*, *EPHX1*, *NFKBIZ*, *SMARCA4* e *BARD1* segregaram corretamente com a apresentação da doença e, portanto, foram considerados os principais genes candidatos associados com a predisposição ao CCR. Além disso, a análise de perda de heterozigose (LOH) nos tumores confirmou a deleção do alelo normal para os genes *CDKN1B*, *XRCC4* e *EPHX1*. Dez genes previamente associados ao desenvolvimento de CCR (*AKR1C4*, *BMPRIA*, *CCDC18*, *MYC*, *POLE*, *BMP4*, *DUSP4*, *LAMA5*, *ENG* e *ATM*) foram identificados com alterações potencialmente deletérias (ESTEBAN-JURADO et al. 2015). EMAMI e SAADAT (2015) utilizando o método de PCR-RFLP interrogaram o gene *XRCC4* em pacientes com CCR e reportaram que embora nenhuma relação entre esses dois polimorfismos genéticos e o risco de desenvolver CCR tenha sido observado na análise global, essas alterações podem aumentar o risco

de CCR em indivíduos com história familiar deste tipo tumoral. Algumas variantes em *BMP4* foram previamente reportadas em pacientes com CCR e portanto, este gene foi apontado como candidato a predisposição ao CCR (TOMLINSON et al. 2011; LUBBE et al. 2011; ZHOU et al. 2015).

KAYSER et al. (2018) investigaram pacientes suspeitos para SL (Amsterdam/Bethesda) sem mutações germinativas nos genes MMR. Os autores realizaram análises de CNV em 77 pacientes e sequenciamento de 77 genes candidatos em 39 pacientes. Vinte e oito pacientes apresentaram 25 deleções e 16 duplicações raras em 73 genes assim como 98 variantes germinativas. As variantes foram identificadas em genes previamente associados ao CCR (*CHEK2*, *APC*, *POLE*, *POLD1*, *MSH2* e *MSH6*). Os autores sugeriram que variantes em *POLE* fora do domínio da exonuclease podem atuar como fatores etiológicos para o CCR hereditário.

1.7 SEQUENCIAMENTO DE ALTO DESEMPENHO EM PACIENTES JOVENS COM CCR

Novas descobertas a partir de estudos com painéis multigênicos também podem contribuir para a caracterização molecular de uma nova forma de câncer de reto familiar, bem como auxiliar na identificação de pacientes jovens com doença em estágios iniciais. Pacientes jovens com CaRe sem história de câncer familiar podem apresentar mutações em genes de predisposição ao câncer e a identificação destes pacientes pode ter implicações significativas para o mesmo e suas famílias.

O sequenciamento de exoma completo em amostras de 23 pacientes chineses com CCR provenientes de 21 famílias com história de CCR em idade jovem revelou

oito variantes germinativas em genes de predisposição ao CCR em 7 pacientes (6 famílias) (ZHANG et al. 2015). Destas, cinco foram classificadas como patogênicas (*MLH1*: c.677G>A, c.453+1G>T e c.208-1G>A; *MUTYH*: c.799C>T e c.857G>A) e 3 variantes (*MLH1*: c.1163_1164insT; *MSH6*: c.2300C>G; *MSH2*: c.793-2A>T) não foram reportadas por bancos de dados públicos (ZHANG et al. 2015). Pela análise de segregação os autores concluíram que a variante *frameshift MLH1*: c.1163_1164insT atua como o principal contribuinte para o desenvolvimento do CCR na família investigada. Em adição, foram identificadas 24 variantes raras afetando 19 genes, três deles envolvidos em vias ativas no CCR (*ATM* e *MAX* presentes na via de reparo ao DNA e *TSC2* na via PI3K/AKT). Uma inserção no gene *EIF2AK4* c.2214_2215insCGACGA foi observada em sete pacientes e não foi reportada em bancos de dados públicos ou local. Uma vez que essa variante poderia ser comum da população chinesa, os pesquisadores avaliaram, por sequenciamento de Sanger, amostras de 100 indivíduos saudáveis e encontraram sete (7%) deles portadores desta variante. Ainda assim, a análise revelou um enriquecimento para o grupo de pacientes com CCR familiar quando comparados com o grupo de referência ($p=0,000604$) e os autores concluíram que este gene pode ser considerado um candidato à predisposição ao CCR (ZHANG et al. 2015). Vale ressaltar que sete dos 23 pacientes foram diagnosticados com câncer de reto em idade jovem sendo identificadas variantes germinativas (*MLH1*, *LRP5*, *RPS6KB2*, *RYR2*, *ATM*, *RYR3* e *EIF2AK4*) em cinco destes pacientes (ZHANG et al. 2015).

Utilizando um painel com 25 genes associados com as síndromes de câncer hereditário, PERLMAN et al. (2017) identificaram 75 variantes patogênicas ou *likely*-patogênicas em 72 de 450 pacientes diagnosticados com CCR antes dos 50 anos de

idade pacientes (16% da casuística). Destes, 13 pacientes tiveram tumores proficientes em MMR e variantes germinativas em genes de alta ou moderada penetrância não tradicionalmente associados ao risco de CCR (*ATM*, *ATM/CHEK2*, *BRCA1*, *BRCA2*, *CDKN2A*, *PALB2*) e 10 pacientes tinham variantes germinativas de baixa penetrância em genes associados ao CCR (*APC* c.3920T>A, p.I1307K, *MUTYH* monoalélico). Além disso, 178 variantes de significado incerto foram identificadas em 32,2% dos pacientes e cinco destas foram reclassificadas como patogênicas ou *likely*-patogênicas após confirmações adicionais (*screening* de mutações no tumor, análise de segregação e história clínica. Em 125 pacientes com CaRe desse estudo, cinco apresentaram mutações em genes MMR, nove em outros genes relacionados ao CCR e seis em genes não relacionados ao CCR (PEARLMAN et al. 2017; YURGELUN et al. 2017).

Um estudo similar, utilizando um painel com 36 genes bem estabelecidos ou com potencial de suscetibilidade ao CCR foi conduzido em 1231 pacientes (153 CCFTX, 548 não selecionados por IHQ ou MSI, 333 com idade inferior a 50 anos, 68 MMR proficiente em indivíduos >50 anos e 129 MMR deficiente sem mutações germinativas nestes genes) (DERYCKE et al. 2017). Os autores identificaram 779 variantes; 92 casos tinham variantes patogênicas em *ATM*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* e *MUTYH*. Quatro casos com mutações patogênicas nos genes MMR eram proficientes para as proteínas MMR por IHQ.

MARTIN-MORALES et al. (2018) avaliaram 98 pacientes categorizados pelos critérios clínicos para SL (Amsterdam I e II) ou Bethesda utilizando um painel de 94 genes de predisposição ao câncer. Os autores identificaram 18 pacientes com 19 variantes patogênicas e oito *likely*-patogênicas, destes 11 com CCR diagnosticados até os 50 anos apresentaram variantes patogênicas/ *likely*-patogênicas em *MLH1*

(c.2050T>G, c.1896+2T>C, c.1731+4A>G, c.677G>T e c.2141G>A), *CHEK2* (c.349A>G), *PMS2* (c.714_720dup), *TP53* (c.783-1G>A), *MSH6* (c.1635_1636delAG), *APC* (c.3199C>T) e *MUTYH* (c.1187G>A). Na análise de segregação, os autores observaram a variante *MLH1* c.2141G>A em um familiar com CCR e em outros 5 membros jovens saudáveis, para os quais foi indicado o aconselhamento genético. O Quadro 4 apresenta os trabalhos que investigaram pacientes jovens com CCR utilizando a metodologia NGS.

Quadro 4 - Dados em literatura utilizando a metodologia NGS para investigar CCR em idade jovem.

Referência	Metodologia	Amostras avaliadas*	Principais resultados
ZHANG et al. 2015	Exoma completo	23 pacientes com CCR (21 famílias) ≤ 40 anos ou a partir de famílias com pelo menos um parente de primeiro grau com CCR ≤ 55 anos	Oito variantes germinativas em genes de predisposição ao CCR em 7 pacientes. Uma variante em <i>MLH1</i> (c.1163_1164insT) não reportada em bancos de dados públicos foi considerada o principal contribuinte para o desenvolvimento do CCR em uma família avaliada. Foram identificadas 24 variantes raras afetando 19 genes, dentre eles <i>ATM</i> e <i>MAX</i> (associados a via de reparo ao DNA) e <i>TSC2</i> (presente na via PI3K/AKT). Uma inserção no gene <i>EIF2AK4</i> c.2214_2215insCGACGA parece contribuir para o risco de CCR familiar.
PERLMAN et al. 2017	Painel com 25 genes associados a síndromes de câncer hereditário	450 pacientes com CCR < 50 anos	75 variantes patogênicas ou <i>likely</i> -patogênicas em 72 pacientes (16% da casuística). Variantes em genes não tradicionalmente associados ao risco de CCR (<i>ATM</i> , <i>ATM/CHEK2</i> , <i>BRCA1</i> , <i>BRCA2</i> , <i>CDKN2A</i> , <i>PALB2</i>) em 13 pacientes com tumor pMMR. Variantes em genes de baixa penetrância associados ao CCR (<i>APC</i> c.3920T>A, p.11307K, <i>MUTYH</i> monoalélico) em 10 pacientes.

Cont/ Quadro 4

Referência	Metodologia	Amostras avaliadas*	Principais resultados
DERYCKE et al. 2017	Painel com 36 genes bem estabelecidos ou com potencial de suscetibilidade ao CCR	1231 pacientes com CCR: 153 CCFTX, 548 não selecionados por IHQ ou MSI, 333 com idade < 50 anos, 68 MMR proficiente em indivíduos >50 anos e 129 MMR deficiente sem variantes germinativas nestes genes	Variantes patogênicas em <i>ATM</i> , <i>MLH1</i> , <i>MSH2</i> , <i>MSH6</i> e <i>MUTYH</i> em 92 casos. Quatro casos com variantes patogênicas nos genes MMR eram proficientes para as proteínas MMR por IHQ.
MARTIN-MORALES et al. 2018	Painel com 94 genes de predisposição ao câncer	98 pacientes categorizados pelos critérios clínicos para SL (Amsterdam I e II) ou Bethesda	19 variantes patogênicas e oito <i>likely</i> -patogênicas em 18 pacientes. 11 pacientes com CCR ≤ 50 anos apresentaram variantes patogênicas/ <i>likely</i> -patogênicas em <i>MLH1</i> , <i>CHEK2</i> , <i>PMS2</i> , <i>TP53</i> , <i>MSH6</i> , <i>APC</i> e <i>MUTYH</i> .

Legenda: *sangue periférico; CCR: Câncer Colorretal; CCFTX: CCR familiar do tipo X; IHQ: imunohistoquímica; MMR: *mismatch repair*; SL: síndrome de Lynch.

Embora o número de casos de câncer de reto em pacientes jovens tenha aumentado consideravelmente nos últimos anos, ainda há um número limitado de estudos que investigam genes associados ao risco de desenvolvimento destes tumores (ZHANG et al. 2015; PEARLMAN et al. 2017; DERYCKE et al. 2017; MARTIN-MORALES et al. 2018).

Neste estudo foram investigadas alterações germinativas associadas ao risco de desenvolvimento de CaRe em pacientes com história de CCR familiar (classificados por Amsterdam I e II) e jovens (com idade igual ou inferior a 40 anos). Foi utilizada a estratégia de sequenciamento de alto desempenho em 93 genes relacionados ao câncer, dentre eles 15 estão envolvidos na via de reparo por recombinação homóloga e sete na via de reparo a erros de pareamento.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar variantes em genes relacionados ao câncer que possam explicar a presença de câncer de reto em pacientes jovens.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar alterações germinativas em pacientes com câncer de reto classificados pelos critérios de Amsterdam I/II e em pacientes jovens classificados por Bethesda, usando target-NGS;
- Comparar as variantes obtidas com dados de sequências humanas depositadas em bancos de dados públicos;
- Investigar a presença das alterações consideradas relevantes em parentes (quando acessíveis) por sequenciamento de Sanger;
- Propor um conjunto de genes com potencial utilidade diagnóstica.

3 CASUÍSTICA

Neste estudo foram utilizadas 29 amostras de pacientes com história familiar de câncer de reto (Grupo 1) categorizados pelos Critérios de Amsterdam e 47 amostras de pacientes com câncer de reto em idade jovem (Grupo 2). Os pacientes selecionados do grupo 2 foram classificados de acordo com o critério de Bethesda (idade) e apresentaram idade igual ou inferior a 40 anos (Critérios de Inclusão). O DNA obtido de sangue periférico foi investigado para a presença de variantes em genes relacionados ao câncer por sequenciamento de genes-alvo. Foi coletada saliva dos familiares (que aceitaram participar do estudo) para avaliar as variantes detectadas nos casos índice. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do AC Camargo Cancer Center (CEP nº 2192/16) e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (parecer CONEP nº1.721.013). Todos os casos-índice e seus familiares assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido antes da coleta de suas amostras e ensaios moleculares.

Os pacientes com CaRe foram submetidos à ressecção cirúrgica e/ ou tratados no A.C. Camargo Cancer Center, São Paulo, entre os anos de 1995 a 2017. Todas as amostras selecionadas para o estudo são provenientes do banco de macromoléculas da Instituição. Os dados clínicos e história familiar destes pacientes estão apresentados nos Quadros 5 e 6 (Grupos 1 e 2, respectivamente) e foram obtidos em parceria com o Departamento de Oncogenética da Instituição..

As variantes resultantes da análise de sequenciamento consideradas relevantes foram avaliadas em pelo menos um familiar afetado ou não por câncer de cada paciente índice do grupo 1 e do grupo 2.

Quadro 5 – Dados dos pacientes com câncer de reto e com a Síndrome de Lynch (Amsterdam I, II ou Amsterdam -1 critério) do grupo I incluindo idade, gênero, história familiar de câncer e expressão das proteínas MMR (quando realizadas) nas amostras tumorais.

ID	Idade/ Gênero	Pólipos	IHQ	História Familiar
A1 ^a	32/ F	Não	Não	Avô mat: leucemia (60 anos). Tia mat: CCR (30 anos). Tia mat: CCR (53 anos). Tio mat: CCR (31 anos). Mãe: CCR (31 anos). Avô pat: ca cerebral. Tia pat: CCR.
A2	29/ M	Não	PMS2+, MSH2+, MSH6+, MLH1+	Avô mat: CCR (66 anos). 2 tias mat: CCR. Prima mat: ca mama (38 anos).
A3	66/ M	Não	MSH2+, MSH6+, MLH1-, PMS2-	Mãe: ca estômago (46 anos). Tio pat: CCR (75 anos). Prima pat: ca rim (35 anos). Avô pat: ca boca (>70 anos).
A4 ^a	28/ F	Sim	PMS2+, MSH2+, MSH6+, MLH1+	Avô pat: CCR (<50 anos). Pai: CCR, ca gástrico e ca tireoide (64 anos). Tia pat: CCR (36 anos). Dois tios pat: CCR (<50 anos). Irmão: polipose colônica (24 anos).
A5	25/ M	Não	Não	Avô: CCR. Tia: CaRe
A6	39/ M	Não	PMS2+, MSH2+, MSH6+, MLH1+	Tio pat: CCR (58 anos). Avô pat: CCR (84 anos). Pai: ca próstata. Tia mat: CCR (78 anos). Tia pat: ca pulmão.
A7	35/ M	Não	PMS2+, MSH2+, MSH6+, MLH1+	Mãe: CCR (52 anos). Primo: CCR (20 anos). Avô mat: ca indeterminado (32 anos). Tio pat: ca indeterminado (63 anos). Pai: ca pulmão (66 anos).
A8	56/ F	Não	Não	Irmão: CCR (52 anos). Irmã: CaRe (57 anos). Irmão: ca esôfago (60 anos). Pai: ca gástrico (72 anos). Irmão: pólipos intestinais (60 anos).
A9	30/ M	Sim	Não	Avô mat: CCR (60 anos). Mãe: CCR (40 anos).
A10	38/ M	Não	PMS2+, MSH2+, MSH6+, MLH1+	Avô mat: CCR (51 anos). Avô mat: ca pulmão (64 anos). Tio mat: ca rim (50 anos). Tio mat: ca indeterminado (65 anos). Tia mat: ca mama (55 anos) e ca bexiga (60 anos). Mãe: Pólipos intestinais (61 anos).
A11	34/ F	Sim	Não	Irmã: CaRe (31 anos). Tia materna: CCR (40 anos). Tia materna: ca útero e mama (35 anos), e CCR (45 anos). Avô mat: ca estômago e CCR (< 60 anos). Avô mat: ca próstata (62 anos). Sobrinho: CaRe (28 anos).
A12	25/ F	Não	Não	Avô mat: ca pâncreas metastático. Avô mat: ca próstata e vários tumores de pele. Tio mat: pólipos intestinal (50 anos) e ca ocular. Tio mat: CCR (70 anos). Tia mat: pólipos intestinal (63 anos) e ca pele. Mãe: ca renal papilífero (59 anos).
A13	71/ M	Não	Não	Mãe: ca útero. Irmã: CCR (55 anos). Filha: pólipos intestinal (50 anos). Filha: CaRe (48 anos).
A14	38/ M	Não	Não	Mãe: CaRe (53 anos). Avô mat: CCR (55 anos). Irmã: CCR (31 anos). Primo mat: CCR (32 anos).
A15 ^a	51/ M	Sim	Não	Avô mat: CCR (70 anos). Tio mat: ca pâncreas (55 anos). Primo mat: CCR (57 anos). Filho do primo mat: ca apêndice (30 anos). Prima mat: CCR (31 anos). Primo mat: ca rim (40 anos) e CCR (60 anos). Filha: CCR (31 anos). Tia-avó mat: CCR e dois filhos com CCR. 3 filhos da outra tia-avó mat: CCR. Tia pat: CCR (75 anos). Tio pat: ca bexiga.

Cont/ Quadro 5

ID	Idade/ Gênero	Pólipos	IHQ	História Familiar
A16	25/ F	Não	Não	Mãe: CCR (63 anos). Tia mat: adenomas (66 anos). Tia mat: CaRe (56 anos). Tia-avó: CCR.
A17	24/ M	Sim	Não	Mãe: CCR. Irmã: CCR
A18	52/ F	Não	Não	Mãe: ca útero (55 anos). Tio mat: CCR (60 anos). Prima mat: CCR e ca útero (34 anos). Tio mat: ca pâncreas (60 anos). Duas tias mat: ca pele (50 e 70 anos).
A19	23/ F	Sim	Não	Avô mat: CCR (60 anos). Tia mat: ca útero (36 anos). Prima mat: CCR (35 anos). Primo mat: CCR (35 anos). Tio-avô mat: ca pele. Tio pat: CCR (50 anos).
A20	25/ F	Não	Não	Pai: ca pâncreas (52 anos). Avô pat: ca pâncreas.
A21	33/ F	Não	Não	Duas tias: ca mama.
A22	23/ M	Sim	PMS2+, MSH2-, MSH6-, MLH1+	Tia mat: CCR (44 anos). Tia mat: ca indeterminado. Avós mat: ca indeterminado. Pai: ca próstata (48 anos). Avô pat: ca próstata. Tio pat: ca próstata (69 anos).
A23	35/ M	Não	Não	Avô pat: ca perna. Avô pat: ca pâncreas. Tia mat: ca mama. Prima pat: CCR. Mãe: ca gástrico.
A24	35/ M	Sim	Não	Avô mat: ca esôfago. Prima mat: ca estômago (45 anos). Tia mat: ca mama (70 anos). Prima mat: CCR metastático – (63 anos).
A25	39/ F	Sim	PMS2+, MSH2+, MSH6+, MLH1+	Irmã: ca mama (45 anos). Tia pat: CCR (70 anos). Mãe: ca tireoide (67 anos).
A26	37/ M	Sim	Não	Avô mat: ca estômago. Tio mat: ca de estômago.
A27	33/ F	Não	Não	Tio mat: ca estômago (60 anos). Tio mat: ca estômago (43 anos).
A28	29/ M	Não	PMS2+, MSH2+, MSH6+, MLH1+	Avô mat: ca faringe. Tio: ca próstata. Pai: ca gástrico. Mãe: ca mama. Irmão: CCR. Irmão: linfoma de Burkitt (8 anos).
A29	35/ F	Sim	Não	Pai: ca gástrico (72 anos). Tio pat: ca pulmão. Tia pat: ca pulmão. Tia pat: CCR (> 70 anos). Prima pat: ca útero (< 40 anos). Prima pat: ca tireoide (40 anos).

Legenda: ID: Paciente; ^a: probandos e alguns familiares selecionados para avaliação de variantes candidatas; IHQ: expressão das proteínas por imuno-histoquímica na amostra tumoral; M: Masculino; F: Feminino; mat: materno; pat: paterno; ca: câncer; CCR: Câncer Colorretal; CaRe: Câncer de Reto.

Quadro 6 – Dados dos pacientes (idade, gênero, história de câncer familiar e expressão das proteínas MMR nos tumores) com câncer de reto em idade jovem incluídos no Grupo 2.

ID	Idade/ Gênero	Pólipos	IHQ	História Familiar
B1	29/ F	Não	Não	Avó mat: ca vesícula
B2	23/ F	Não	Não	Não
B3	37/ F	Não	Não	Não
B4	33/ F	Sim	PMS2+, MSH2+, MSH6+, MLH1+	Avô pat: ca próstata (> 60 anos). Irmã: pólipos adenomatosos (40 anos)
B5	25/ F	Não	Não	Tia pat: leucemia (38 anos). Primo mat (2º grau): CCR (45 anos)
B6	37/ F	Não	PMS2+, MSH2+, MSH6+, MLH1+	Irmã: ca útero (36 anos). Avô: CCR. Avó mat: CCR. Irmã: CaRe.
B7	38/ M	Sim	Não	Avô pat: ca gástrico (69 anos)
B8	34/ F	Não	PMS2+, MSH2+, MSH6+, MLH1+	Não
B9	30/ M	Não	Não	Irmã: ca mama.
B10	35/ M	Não	Não	Tia: ca mama e útero (50 anos). Avô: ca próstata (74 anos)
B11	37/ M	Não	PMS2+, MSH2+, MSH6+, MLH1+	Tia mat: ca colo uterino
B12	35/ F	Não	PMS2+, MSH2+, MSH6+, MLH1+	Irmã: pólipos intestinais (35 anos)
B13	40/ M	Não	PMS2+, MSH2-, MSH6-, MLH1+	Avó pat: ca estômago (63 anos). Prima: ca estômago (48 anos). Tio pat: ca indeterminado (60 anos)
B14	37/ M	Sim	Não	Pai: ca bexiga e próstata (58 anos). Avó mat: ca pulmão (70 anos). Bisavô mat: ca estômago
B15 ^a	34/ M	Sim	Não	Irmã: pólipos intestinais (34 anos). Avó mat: ca estômago (64 anos). Avô pat: ca estômago (70 anos)
B16	36/ M	Não	Não	Não
B17	31/ F	Não	PMS2+, MSH2+, MSH6+, MLH1+	Não
B18	36/ F	Sim	Não	Não

Cont/ Quadro 6

ID	Idade/ Gênero	Pólipos	IHQ	História Familiar
B19	37/ F	Sim	Não	Desconhece (filha adotiva)
B20	37/ F	Sim	Não	Pai: CCR (80 anos)
B21	23/ F	Não	PMS2+, MSH2+, MSH6+, MLH1+	Tia pat: CaRe (56 anos)
B22	27/ F	Não	PMS2+, MSH2+, MSH6+, MLH1+	Primo da mãe: CCR (35 anos)
B23	29/ M	Não	Não	Não
B24	39/ M	Não	Não	Tio mat: ca próstata (50 anos). Prima mat: ca útero (15 anos). Bisavó mat: ca pele. Sobrinho: leucemia. Prima mat: ca tireoide (38 anos)
B25	40/ F	Não	PMS2+, MSH2+, MSH6+, MLH1+	Pai: ca pâncreas
B26	34/ M	Não	PMS2+, MSH2+, MSH6+, MLH1+	Tia avó pat: ca SNC (> 60 anos). Tia avó pat: ca mama (> 60 anos). 3 irmãs: epilepsia
B27	38/ M	Não	Não	Tio pat: câncer indeterminado
B28	38/ M	Sim	PMS2+, MSH2+, MSH6+, MLH1+	Não
B29 ^a	23/ F	Sim	PMS2+, MSH2+, MSH6+, MLH1+	Mãe: CCR (PAF – 22 anos). Irmã: Polipose colônica (PAF – 18 anos)
B30	35/ M	Não	PMS2-, MSH2+, MSH6+, MLH1-	Não
B31 ^a	29/ F	Sim	PMS2+, MSH2+, MSH6+, MLH1+	Tio pat: CaRe (58 anos). Tio: ca pulmão
B32	32/ F	Não	PMS2+, MSH2+, MSH6+, MLH1+	Avó mat: ca útero, estômago e CCR
B33	40/ M	Não	PMS2+, MSH2+, MSH6+, MLH1+	Primo mat: CCR (46 anos).

Cont/ Quadro 6

ID	Idade/ Gênero	Pólipos	IHQ	História Familiar
B34	35/ F	Não	Não	Tia: ca mama (45 anos)
B35	32/ F	Não	PMS2+, MSH2+, MSH6+, MLH1+	Não
B36	35/ M	Sim	Não	Não
B37	22/ F	Não	PMS2+, MSH2+, MSH6+, MLH1+	Primo (2º grau): ca cabeça e pescoço (15 anos)
B38	38/ F	Não	PMS2+, MSH2+, MSH6+, MLH1+	Avô mat: ca próstata (62 anos). Avô mat: ca mama (80 anos). Tia mat: ca tireoide (50 anos). Tia mat: ca esôfago (52 anos). Tia mat: ca rim e útero (57 anos). Tia mat: leucemia (15 anos). Prima mat: ca mama (43 anos).
B39	35/ F	Sim	PMS2+, MSH2+, MSH6+, MLH1+	Não
B40	32/ M	Não	Não	Não
B41	35/ F	Não	PMS2+, MSH2+, MSH6+, MLH1+	Tio pat: leucemia. Prima mat: ca colo de útero (44 anos). Prima mat: ca colo de útero (42 anos). Tia mat: ca colo de útero (30 anos). Tio mat: leucemia crônica (46 anos). Primo mat: leucemia (13 anos).
B42	32/ F	Não	PMS2+, MSH2+, MSH6+, MLH1+	Tia pat: CCR (45 anos). Avô pat: ca útero (76 anos). Primo mat: leucemia (34 anos). Tio-avô mat: ca estômago (58 anos). Prima mat: ca mama (48 anos).
B43	28/ M	Não	PMS2+, MSH2+, MSH6+, MLH1+	Tio pat: ca próstata (>50 anos). Tio avô mat: ca próstata (>50 anos). Tia avô mat: ca mama (>50 anos).
B44	35/ F	Não	PMS2+, MSH2+, MSH6+, MLH1+	Não
B45 ^a	32/ F	Sim	PMS2+, MSH2+, MSH6+, MLH1+	Bisavô pat: CCR (> 60 anos). Avô pat: ca fígado (42 anos). Tia: ca estômago (52 anos).
B46 ^a	39/ F	Sim	Não	Pai: ca bexiga com metástase óssea (63 anos). Avô pat: ca laringe (62 anos). Avô pat: ca indeterminado (33 anos). Tia pat: ca cutaneo. Avô mat: ca renal (55 anos). Tio mat: ca estômago (<50 anos). Irmã: ca tireoide (51 anos).
B47	24/ M	Sim	Não	Avô pat: CCR (80 anos). Primo pat (4º grau): múltiplos tumores (< 45 anos).

Legenda: ID: Paciente; ^a: probandos e alguns familiares selecionados para avaliação de variantes candidatas; IHQ: expressão das proteínas por imuno-histoquímica na amostra tumoral; M: Masculino; F: Feminino; mat: materno; pat: paterno; ca: câncer; CCR: Câncer Colorretal; CaRe: Câncer de Reto; PAF: polipose adenomatosa familiar.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 EXTRAÇÃO DE DNA

As amostras de DNA foram obtidas do banco de macromoléculas do A.C.Camargo Cancer Center, SP. A extração do DNA genômico foi realizada a partir de amostras de sangue dos probandos usando o kit *Gentra Puregene Blood* (Qiagen, Valencia, CA, USA) e seguindo as recomendações do fabricante.

Para extração e purificação de DNA de amostras de saliva foi utilizado o protocolo prepIT•L2P (DNA Genotek, Ottawa, CAN), seguindo as recomendações do fabricante. Inicialmente, as amostras foram incubadas em banho-maria a 50°C por 90 minutos. Em seguida, 20µL de PT-L2P foram adicionados em 500µL de cada amostra. Após vórtex, as amostras foram incubadas em gelo por 10 minutos e centrifugadas a 15000 rcf por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo sendo adicionados 600µL de EtOH 100%. Após misturar por 10 vezes por inversão, as amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 10 minutos para permitir a precipitação do DNA. Procedeu-se a centrifugação a 15000 rcf por 2 minutos. Cuidadosamente, o sobrenadante foi descartado e adicionados 250µL de EtOH 70% ao pellet de DNA. Após incubação por 1 minuto a temperatura ambiente, foram adicionados 30 µL de solução TE ao pellet de DNA. Para garantir a completa rehidratação do DNA, as amostras foram incubadas a temperatura ambiente *overnight*, seguido por vórtex e quantificação.

A qualidade do material extraído foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1,5% e o DNA foi quantificado pelo Kit *Qubit® dsDNA BR Assay (Qubit® 2.0 Fluorometer*, Life Technologies).

4.2 SEQUENCIAMENTO DE ALTO DESEMPENHO EM GENES ALVOS

Esta etapa foi realizada em colaboração com o *Department of Clinical Genetics, University Hospital of Southern Denmark, University of Southern Denmark (SDU)* Vejle, Dinamarca, a qual foi aprovada pelo CEP/CONEP (CEP n°2192/16, parecer CONEP n° 1.721.013).

A primeira etapa consistiu na quantificação do DNA genômico utilizando o kit *Qubit dsDNA BR Assay* de acordo com as especificações do fabricante. A biblioteca de DNA foi preparada utilizando o kit *SureSelectQXT Library Prep (Agilent, Santa Clara, CA)* para o sequenciamento de 93 genes relacionados ao câncer (*SureSelectXT Custom Panel; Agilent, Santa Clara, CA – Quadro 7*) utilizando *SureDesign (Agilent, Santa Clara, CA)*. Foram sequenciados os éxons e as regiões flanqueadoras (5' UTR e 3' UTR) de cada éxon. O sequenciador utilizado foi o *NextSeq 500 (Illumina, San Diego, CA)*, conforme instruções do fabricante.

Quadro 7 – Pannel de 93 genes associados ao câncer avaliados neste estudo.

<i>ABCC1</i>	<i>CTNNB1</i>	<i>FOXL2</i>	<i>MLH1</i> ^a	<i>RAD50</i> ^b
<i>ABCG2</i>	<i>DICER1</i>	<i>GALNT12</i>	<i>MLH3</i> ^a	<i>RAD51B</i> ^b
<i>AKT1</i>	<i>DNMT3A</i>	<i>GNA11</i>	<i>MSH2</i> ^a	<i>RAD51C</i> ^b
<i>ALK</i>	<i>DNMT3B</i>	<i>GNAQ</i>	<i>MSH6</i> ^a	<i>RAD51D</i> ^b
<i>APC</i>	<i>EGF</i>	<i>GREM1</i>	<i>MTHFR</i>	<i>RB1</i>
<i>AR</i>	<i>EGFR</i>	<i>HGF</i>	<i>MTOR</i>	<i>RET</i>
<i>AREG</i>	<i>EPCAM</i>	<i>HRAS</i>	<i>MUS81</i> ^b	<i>SCG5</i>
<i>ARF1</i>	<i>ERBB2</i>	<i>HSPH1</i>	<i>MUTYH</i>	<i>SMAD4</i>
<i>ATM</i> ^b	<i>ERBB3</i>	<i>IDH1</i>	<i>MYC</i>	<i>STAT3</i>
<i>BARD1</i> ^b	<i>ERBB4</i>	<i>IDH2</i>	<i>NF1</i>	<i>STK11</i>
<i>BMP1A</i>	<i>EREG</i>	<i>IGF1</i>	<i>NOTCH1</i>	<i>TGFA</i>
<i>BRAF</i>	<i>EZH2</i>	<i>IGF1R</i>	<i>NRAS</i>	<i>TP53</i>
<i>BRCA1</i> ^b	<i>FBXW7</i>	<i>JAK1</i>	<i>PALB2</i> ^b	<i>TYMS</i>
<i>BRCA2</i> ^b	<i>FGF1</i>	<i>JUN</i>	<i>PIK3CA</i>	<i>VEGFA</i>
<i>BRIP1</i> ^b	<i>FGFR1</i>	<i>KDM4C</i>	<i>PMS2</i> ^a	<i>VHL</i>
<i>CCND1</i>	<i>FGFR2</i>	<i>KIT</i>	<i>POLD1</i> ^c	<i>WNT1</i>
<i>CDH1</i>	<i>FLT1</i>	<i>KRAS</i>	<i>POLE</i> ^c	<i>XRCC2</i> ^b
<i>CDKN2A</i>	<i>FLT3</i>	<i>MAP2K1</i>	<i>POT1</i>	
<i>CHEK2</i> ^b	<i>FLT4</i>	<i>MET</i>	<i>PTEN</i>	

^a Genes associados a via MMR; ^b Genes associados a via HR; ^c Genes associados a via MMR e HR. Estão destacados em **negrito** os genes bem estabelecidos como associados a predisposição ao CCR.

As etapas para o preparo das bibliotecas foram realizadas de acordo com as especificações do fabricante e incluiu passos de (1) fragmentação enzimática do DNA e ligação de adaptadores às extremidades dos fragmentos, (2) purificação das bibliotecas ligadas a adaptadores, (3) amplificação das bibliotecas, (4) purificação das bibliotecas amplificadas, (5) avaliação da quantidade e qualidade do DNA, (6) hibridação, (7) captura das sondas hibridadas, (8) amplificação da biblioteca capturada e adição de index, (9) Purificação das bibliotecas amplificadas, (10) avaliação da qualidade e quantidade das bibliotecas, (11) preparo do pool das amostras para sequenciamento. Essas etapas estão detalhadamente apresentadas abaixo.

1. Fragmentação do DNA e ligação de adaptadores às extremidades dos fragmentos:

Inicialmente, 2µL de DNA (25ng/µL) foram incubados com 17 µl de *SureSelect QXT Buffer* e 2 µl de *SureSelect QXT Enzyme Mix* durante 10 minutos a 45°C. Posteriormente foram adicionados 32 µL de 1X *SureSelect QXT Stop Solution* a cada amostra e após vórtex, as amostras foram incubadas por 1 minuto à temperatura ambiente.

2. Purificação das bibliotecas ligadas a adaptadores:

O DNA fragmentado foi purificado pela adição de 52µL de *AMPure XP beads*. A solução foi homogeneizada por 5 segundos em vórtex e após breve centrifugação, foi incubada por 5 minutos à temperatura ambiente. Após esse período, a placa contendo as amostras foi mantida em uma estante magnética por 5 minutos, o sobrenadante foi removido e as amostras foram lavadas com 200µL de etanol 70% por 1 minuto. O etanol foi removido e mais 200µL foram adicionados por mais 1 minuto. As amostras foram mantidas a 37°C (1 a 3 minutos), 11µL de água foram adicionados a cada poço contendo as beads. Após agitação em vórtex, as amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 2 minutos. A placa foi transferida para uma estante magnética por 2 minutos e 10µL do sobrenadante foi transferido para um novo tubo.

3. Amplificação das bibliotecas:

A etapa de amplificação foi realizada em um volume de 50µL contendo: 25µL de água, 10µL de *Herculase II 5× Reaction Buffer*, 0.5µL de 100 mM dNTP Mix, 2,5µL de DMSO, 1µL de *SureSelect QXT Primer Mix*, 1µL de *Herculase II Fusion DNA Polymerase* e 10µL da biblioteca purificada, utilizando as seguintes condições: 68°C por 2 minutos, 98°C por 2 minutos, seguido por 8 ciclos a

98°C por 30s, 57°C por 30s e 72°C por 1 minuto, seguido de 72°C por 5 minutos.

4. *Purificação das bibliotecas amplificadas*: Esta etapa foi realizada utilizando 50µL de *AMPure XP beads* nas mesmas condições descritas anteriormente (Passo 2). Na etapa final da purificação, 13µL da biblioteca foram transferidos para um novo tubo.

5. *Avaliação da quantidade e qualidade das bibliotecas*: Nesta etapa foram utilizadas a *D1000 ScreenTape kit* e a *Agilent TapeStation*. As amostras foram preparadas adicionando 1µL da biblioteca amplificada e purificada e 3µL do tampão D100 e análise foi realizada de acordo com as informações do fabricante. O DNA fragmentado apresentou um pico posicionado entre 245 e 325pb.

6. *Hibridação*: Um total de 750ng da biblioteca (em 12µL de água) foi homogeneizado com 5 µL de *SureSelect QXT Fast Blocker Mix* e mantidos a 95°C por 5 minutos, 65°C por 10 minutos, 65°C por 1 minuto. Nesse momento, o termociclador foi pausado para a adição de 13µL do mix *Capture Library Hybridization* contendo 2µL de 25% *RNase Block solution*, 2µL de *Capture Library*, 6µL de *SureSelect QXT Fast Hybridization Buffer* e 3µL de água. Após a adição deste mix, as amostras foram submetidas a 60 ciclos de 65°C por 1 minuto e 37°C por 3 minutos seguidos de 65°C até o início da próxima etapa.

7. *Captura das amostras hibridadas*: Nessa etapa foram utilizadas *Dynabeads MyOne Streptavidin T1* lavadas previamente três vezes com 200µL de *SureSelect Binding Buffer* por 5 minutos e ressuspensas nesse mesmo tampão. Os 30µL da solução

contendo o DNA hibridado de cada amostra foram transferidos para um poço da placa contendo as *beads* e foram incubados a temperatura ambiente com agitação de 1800rpm por 30 minutos. A placa foi então mantida por 1 minuto na estante magnética e o sobrenadante foi descartado. As *beads* foram então ressuspensas em 200 μ L de *SureSelect Wash Buffer 1* e placa foi então mantida por 1 minuto na estante magnética e o sobrenadante foi descartado. As *beads* foram então ressuspensas em 200 μ L de *SureSelect Wash Buffer 2* previamente aquecido a 65°C e as amostras foram incubadas nessa mesma temperatura por 10 minutos. Essa última etapa da lavagem foi realizada três vezes. A placa foi transferida para uma estante magnética e o sobrenadante descartado e então 23 μ L foram adicionados a cada poço. A placa foi mantida em gelo até o início da próxima etapa.

8. *Amplificação da biblioteca capturada e adição de index*: Um total de 25 μ L de mix contendo 13,5 μ L de água, 10 μ L de *Herculase II 5 \times Reaction Buffer*, 0,5 μ L de 100 mM dNTP Mix e 1 μ L de *Herculase II Fusion DNA Polymerase* foi adicionado a cada poço contendo as amostras obtidas na etapa anterior. Foi também adicionado 1 μ L de cada *index* P5 e P7 de modo a criar uma identificação única para cada amostra. As amostras foram amplificadas em termociclador com as seguintes condições: 98°C por 2 minutos, seguido de 12 ciclos de 98°C por 30 segundos, 58°C por 30 segundos e 72°C por 1 minutos e extensão final de 72°C por 5 minutos. Após a amplificação, a placa foi mantida numa estante magnética por 2 minutos e o sobrenadante transferido para uma nova placa e as *beads* descartadas.

9. *Purificação das bibliotecas capturadas e amplificadas:* A purificação das bibliotecas amplificadas foi realizada utilizando 60 μ L de *AMPure XP beads* nas mesmas condições descritas anteriormente (Passo 2). Na etapa final da purificação, 25 μ L da biblioteca foram transferidos para um novo tubo.

10. *Avaliação da qualidade e quantidade das bibliotecas:* A avaliação das bibliotecas foi feita utilizando *High Sensitivity DNA e Agilent TapeStation*. As amostras foram preparadas adicionando 2 μ L da biblioteca amplificada e purificada e 2 μ L do tampão *High Sensitivity D100*. A análise foi realizada de acordo com as informações do fabricante. O DNA fragmentado apresentou um pico posicionado entre 325-450pb.

11. *Pool das amostras:* As amostras foram combinadas em um volume final contendo a mesma quantidade equimolar de cada biblioteca e preparadas para serem sequenciadas utilizando NextSeq 500 (Illumina, San Diego, CA) de acordo com as instruções do fabricante.

Os dados brutos do sequenciamento foram processados sendo gerados um arquivo com as sequências FASTQ. As sequências dos adaptadores e dos *primers* foram removidas utilizando o método *TrimGalore*. O arquivo foi alinhado ao genoma humano (hg19) pelo programa BWA para produzir arquivos BAM e as sequências duplicadas devido a artefatos da PCR foram excluídas utilizando a ferramenta *markDup (SAMBAMBA)*. Em seguida, as sequências foram realinhadas ao genoma humano (hg19) e realizada a chamada de variantes pelo GATK para identificar o sítio em que pelo menos uma das bases difere da sequência de referência. Foi gerado um

arquivo VCF após a identificação das variantes. Foram identificadas variantes de nucleotídeo único (SNV – *single nucleotide variants*) e inserções/deleções, as quais foram manualmente interpretadas e revisadas. As análises iniciais de bioinformática foram feitas em colaboração com a equipe do *Dept of Clinical Genetics Dept, Vejle Hospital, SDU, DK*. A Figura 3 ilustra o pipeline utilizado para a análise dos dados.

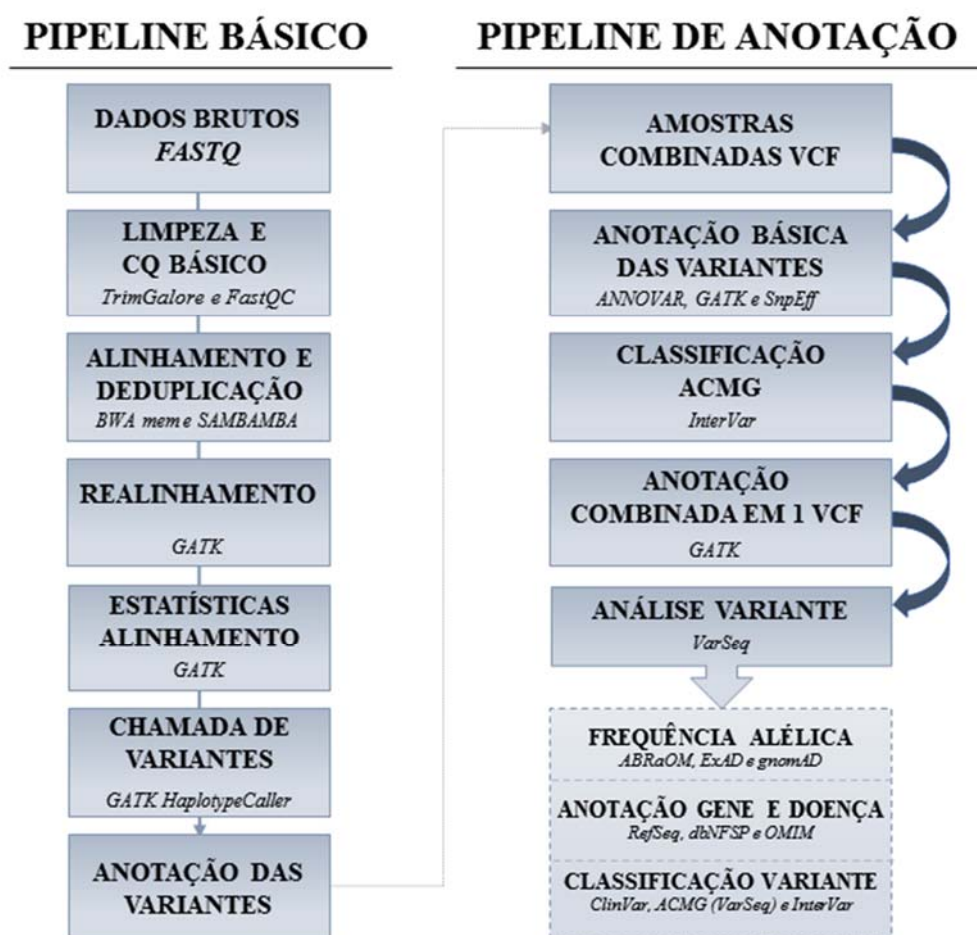


Figura 3 - *Pipeline* utilizado para o processamento dos dados brutos gerados do sequenciamento de 93 genes relacionados ao câncer em amostras de pacientes com câncer de reto. Estão indicados os pacotes, programas e banco de dados utilizados para a comparação de frequência alélica e classificação das variantes de acordo com a patogenicidade.

A análise das sequências foram realizadas utilizando o *software* VarSeq 2.1.0 (Golden Helix, USA) sendo removidas as *reads* não sequenciadas pelas duas fitas utilizadas durante o sequenciamento (*strand Bias-Fisher* – FS <30). As variantes foram anotadas utilizando os programas *ANNOVAR*, *GATK* e *SnpEFF* e classificadas utilizando o ACMG (*American College of Medical Genetics 2018*). Foi gerado um arquivo único VCF contendo todas as informações integradas (amostras, anotações básicas das variantes e classificação ACMG), o qual foi utilizado para fazer análise de cada uma das variantes utilizando o *software* VarSeq. As variantes identificadas foram comparadas com outros bancos de dados em relação a frequência (*gnomAD Genomes*, *gnomAD Exomes* e *ABRaOM*), descrição do gene e associação com doença (*RefSeq*, *dbNSFP* e *OMIM*), e classificação das variantes (*ClinVar*, *ACMG* e *InterVar*). Para a seleção de variantes germinativas nos 76 pacientes foram utilizados os seguintes critérios: variantes heterozigotas ou homozigotas, não classificadas como benignas ou *likely*-benignas pelo ACMG, frequência do alelo variante > 0,2 no sequenciamento e < 0,02 nas populações em geral. As demais variantes foram curadas manualmente usando o *GenomeBrowse* (Golden Helix Inc., EUA) para garantir um sequenciamento de qualidade. Para isso, foram estabelecidos os seguintes parâmetros: variantes cobertas por pelo menos 10 *reads*, *reads* presentes em ambas as fitas (*Forward* e *Reverse*) e não presentes em regiões de homopolímeros (foram excluídas variantes com mais de seis nucleotídeos iguais incorporados a sequência).

As variantes foram submetidas a análises supervisionadas utilizando o pacote *maftools* no programa R (www.r-project.org). Para essas análises foram excluídas todas as variantes intergênicas, sinônimas e em regiões 3'UTR e 5'UTR.

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística foi utilizado o programa Statistics Packet for Social Sciences-SPSS, versão 21.0 (SPSS, Chicago, IL, USA). As variantes patogênicas, *likely*-patogênicas e VUS em genes das vias MMR (*MLH1*, *MLH3*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*, *POLD1* e *POLE*), HR (*ATM*, *BARD1*, *BRCA1*, *BRCA2*, *BRIP1*, *CHEK2*, *MUS81*, *POLD1*, *POLE*, *RAD50*, *RAD51B*, *RAD51C* e *XRCC2*) e associados ao CCR: *APC*, *BMPRIA*, *CDKN2A*, *EPCAM*, *GALNT12*, *GREM1*, *MUTYH* e *STK11*, foram investigadas de acordo com as características clínicas. O teste de Qui-Quadrado ou Exato de Fisher foi utilizado para estudar associações entre as variáveis qualitativas, de acordo com as frequências.

A análise de sobrevida livre de doença foi realizada pelo método de Kaplan-Meier (KAPLAN e MEIER 1958) e teste de log rank (PETO e PETO 1972), para variantes detectadas nos genes MMR, HR e associados ao CCR.

4.4 CONFIRMAÇÃO DAS ALTERAÇÕES

Ao final da análise dos dados de sequenciamento, foram selecionados algumas variantes para serem confirmadas nos probandos e membros de algumas famílias. As variantes alélicas consideradas relevantes foram investigadas por sequenciamento de Sanger nos familiares que concordaram em participar do estudo.

O Quadro 8 lista as variantes selecionadas nos genes *ATM*, *APC*, *CCND1*, *CDKN2A*, *MSH2*, *MTHFR*, *MUTYH*, *PMS2* e *POLD1* para confirmação nos casos índices e familiares. Os critérios utilizados para selecionar foram: (a) genes associados

ao risco aumentado de CCR (*APC*, *MSH2*, *MUTYH*, *PMS2* e *POLD1*), (b) gene de predisposição a tumores hereditários, incluindo os CCR (*ATM*), (c) *MTHFR* por desempenhar um papel importante na via metabólica do DNA e a mesma variante ter sido detectada em três pacientes não aparentados, (d) *CCND1* onde uma variante foi predita com potencial patogênico em 5 de 6 bancos de dados e se apresentou alterada em um paciente Amsterdam I sem variantes germinativas em genes associados ao CCR, (e) *CDKN2A*, por ser um gene supressor de tumor encontrado alterado em um paciente com forte história familiar de câncer sem alterações importantes em genes associados ao CCR.

Quadro 8 – Genes e variantes selecionadas investigadas nos familiares de acordo com os critérios estabelecidos.

CASOS ÍNDICES						FAMILIARES			
Gene	Variante	Tipo de variante	Classificação ACMG	Predição dbNFSP	Caso	Caso	Parentesco	Fenótipo	Idade ao diagnóstico (anos)
ATM	c.4303A>T	Stop gained	Patogênica	2/6	A1	A1-1	Tia materna	CCR	53
						A1-2	Filha	Saudável	19
						A1-3	Filho	Saudável	16
	c.4414T>G	Missense	VUS	4/6	A4	A4-1	Irmão	Polipose colônica	24
	c.8840C>A/ c.640+31056G>T	Missense	VUS	4/6	A8	A8-1	Irmão	Pólipos intestinais	60
						A8-2	Filha	Saudável	39
c.2942 2943insTA	Frameshift	VUS	-	A4	A4-1	Irmão	Polipose colônica	24	
APC	c.-43A>C	5 prime UTR	VUS	-	A10 ^a , A15	A15-1	Filha	CCR	31
						A15-2	Filha	Saudável	38
						A15-3	Primo	Câncer de rim	60
						A15-4	Filho do Primo	Adenocarcinóide no apêndice	31
	c.5236A>G	Missense	VUS	3/6	B31	B31-1	Pai	Saudável	64
						B31-2	Irmão	Saudável	34
						B31-3	Tio paterno	CCR	58
						B31-4	Tio paterno	Câncer de próstata/ leucemia mielóide crônica	68/71
CCND1	c.779G>A	Missense	VUS	5/6	A15	A15-1	Filha	CCR	31
						A15-2	Filha	Saudável	38
						A15-3	Primo	Câncer de rim	60
						A15-4	Filho do Primo	Adenocarcinóide no apêndice	31
CDKN2A	c.170C>A	Missense	VUS	1/6	B46	B46-1	Irmã	Câncer de tireoide	51
						B46-2	Irmã	Saudável	55
MSH2	c.1444A>T	Stop gained	Patogênica	2/6	A1	A1-1	Tia materna	CCR	53
						A1-2	Filha	Saudável	19
						A1-3	Filho	Saudável	16
MTHFR	c.1555C>T	Missense	VUS	4/6	A7 ^a , A8, B32 ^a	A8-1	Irmão	Pólipos intestinais	60
						A8-2	Filha	Saudável	39

Cont/ Quadro 8

CASOS ÍNDICES						FAMILIARES			
Gene	Variante	Tipo de variante	Classificação ACMG	Predição dbNFSP	Caso	Caso	Parentesco	Fenótipo	Idade diagnóstica
MUTYH	c.1227_1228dupGG	<i>Frameshift</i>	VUS	-	B15	B15-1	Irmã	Polipose	42
	c.536A>G	<i>Missense</i>	<i>Likely</i> -Patogênica	6/6	B45	B45-1	Pai	Saudável	62
	c.902C>G	<i>Missense</i>	VUS	6/6		B45-2	Irmão	Saudável	36
						B45-3	Irmã	Saudável	37
PMS2	c.2264T>C	<i>Missense</i>	VUS	5/6	B46	B46-1	Irmã	Câncer de tireoide	51
						B46-2	Irmã	Saudável	55
POLD1	c.353C>T	<i>Missense</i>	VUS	0/6	B29	B29-1	Irmã	Polipose colônica	18

Legenda: VUS: Variante de significado incerto. Estão destacados em **negrito** os genes de predisposição ao CCR. ^a:paciente não incluído para confirmação dos achados.

Essa análise confirmatória foi específica para a região gênica onde foi encontrada alguma alteração candidata associada ao fenótipo. Para isso foram desenhados iniciadores que flanqueiam as regiões de interesse detectadas pelo tNGS utilizando a ferramenta *webtool Primer3* (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). Os iniciadores foram sintetizados pela TAG Copenhagen (Frederiksberg, DK). Os genes, variantes e sequências desenhadas para cada iniciador estão representados no Quadro 9, no entanto não foi desenhado *primer* para a variante *MUTYH: c.1227_1228dupGG* uma vez que ao entrar em contato com o paciente B15 fomos notificados que o mesmo e suas irmãs já fizeram o teste genético para este gene.

A amplificação pela PCR foi realizada utilizando o kit *Qiagen Multiplex PCR Master Mix* (Qiagen), seguindo as recomendações do fabricante. Resumidamente, foram adicionados 5µL de *2X Qiagen Multiplex PCR Master Mix*, 2µL de *10X Primermix* (2 µM cada *primer*), 2,5µL de água e 0,5µL de DNA. As amostras foram amplificadas em termociclador com as seguintes condições: 95°C por 15 minutos, seguido de 34 ciclos de 94°C por 30 segundos, 62°C por 90 segundos e 72°C por 30 segundos e extensão final de 72°C por 10 minutos. O produto da PCR e os controles positivo e negativo foram avaliados usando *Agilent D1000 Screen Tape* (Agilent, Germany). O produto foi tratado com 2µL de *ExoProStar™ 1-Step* (GE Healthcare Life Sciences) e 5µL do produto de PCR. O mix de pré-sequenciamento foi preparado usando o kit *BigDye™ Terminator v1.1 Cycle Sequencing* (Thermofischer), de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram preparadas para a eletroforese a partir do kit *BigDye XTerminator® Purification* (Thermofisher) usando 45µL de *SAM™ Solution* and 10µL de *XTerminator™ Solution* por amostra. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas a cada 15 minutos por duas vezes e sequenciadas pelo

ABI 3130 Genetic Analyzer (Thermofisher). Os resultados obtidos foram analisados utilizando o *CLC Genomics Workbench* (CLC bio).

Quadro 9 – Dados dos genes, variantes e sequências avaliadas pelo sequenciamento de Sanger.

Gene	Variante	Forward	Reverse
<i>ATM</i>	c.4303A>T	AATTCTTCTTGCCATATGTGAGC	CCAGGAGGTTGAGGATGCA
	c.4414T>G		
	c.8840C>A/ c.640+31056G>T	CATAGGCTCAGCATACTACACAT	CCTGATGAGATACACAGTCTACC
<i>APC</i>	c.2942_2943insTA	CTGCTGCCCATACACATTCA	TAGGTCGGCTGGGTATTGAC
	c.-43A>C	GGAAGCGGAGAGAGAAGCAG	CTACCCCATTTCCGAGTCCG
	c.5236A>G	GGCAGAAGTACAGATGAGGC	GTTGGGTGCAGAAGAAGACG
<i>CCND1</i>	c.779G>A	CTCAGGTCAGAGGAGGCAG	TGGGGTCCATGTTCTGCTG
<i>CDKN2A</i>	c.170C>A	ACGGGTCGGGTGAGAGTG	AAGCTTCCTTTCCGTCATGC
<i>MSH2</i>	c.1444A>T	TTTTGTCACCTTGTCTGTTTGC	AGAATTGGGCTTGGTGATCC
<i>MTHFR</i>	c.1555C>T	GGCCTACCTTCACATTGACA	CCCTTTGCTTATGGACGTGC
<i>MUTYH</i>	c.536A>G	CCCCCTAGCTCCTCTACCAC	CGGGTGATCTCTTTGACCTC
	c.902C>G	AGGGTTGAGTGTCATAGGGC	GGCCAGGAGATTTCAACCAA
<i>PMS2</i>	c.2264T>C	AGTTTCACTCTTGTTGCCCA	CAGACTCTCAACTTAACTGCTGT
<i>POLD1</i>	c.353C>T	CCCCAAGGTATTTGAGGCT	GGGGTGTAGAAGTAGGGAGC

Legenda: Estão destacados em **negrito** os genes de predisposição ao CCR.

5 RESULTADOS

Foram incluídos neste estudo 76 pacientes diagnosticados com câncer de reto entre os anos de 1995 e 2017; destes, 29 foram classificados pelos critérios de Amsterdam I/II (Grupo 1) e 47 de acordo com a idade (≤ 40 anos) (Grupo 2). Embora a idade não tenha sido um critério para inclusão de pacientes do Grupo 1, a maioria (82,2%) era jovem com idade igual ou inferior a 40 anos. A proporção de homens e mulheres nos dois grupos foi semelhante (Grupo 1: 55,2% homens e Grupo 2: 59,6% mulheres). Em ambos os grupos, a maioria dos pacientes não apresentava hábito etilista (Grupo 1: 69% e Grupo 2: 66%) e tabagista (Grupo 1: 79,3% e Grupo 2: 70,2%) e não tinha história de pólipos intestinais (Grupo 1: 62,1% e Grupo 2: 68,1%). Os pacientes foram diagnosticados em estágio clínico avançado em proporções semelhantes nos dois grupos (EC III ou IV - Grupo 1: 65,5% e Grupo 2: 63,8%). Em geral, o tumor estava localizado no reto baixo ou médio (Grupo 1: 69% e Grupo 2: 63,9%) e o paciente não apresentava metástase ao diagnóstico (Grupo 1: 75,9% e Grupo 2: 80,9%). Não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos para estas variáveis. A Tabela 1 sumariza as características clínico-patológicas dos 76 pacientes incluídos no estudo.

Tabela 1 - Dados clínicos e patológicos dos 76 pacientes incluídos no estudo, 29 do Grupo 1 e 47 do Grupo 2.

Característica		Grupo 1	Grupo 2	Total
		N (%)	N (%)	N (%)
Idade ao diagnóstico	Média - desvio padrão	36 - 12,3	33,2 - 5,01	34,3 - 8,59
	Mediana - mínimo-máximo	34 - 23-71	35 - 22-40	35 - 22-71
	≤ 40 anos	24 (82,8)	47 (100)	71 (93,4)
	> 40 anos	5 (17,2)	0 (0)	5 (6,6)
Sexo	Feminino	13 (44,8)	28 (59,6)	41 (53,9)
	Masculino	16 (55,2)	19 (40,4)	35 (46,1)
Peso ao diagnóstico	Abaixo do peso	1 (3,5)	1 (2,1)	2 (2,6)
	Ideal	11 (37,9)	25 (53,2)	36 (47,4)
	Sobrepeso	8 (27,6)	12 (25,5)	20 (26,3)
	Obesidade Grau I	5 (17,2)	3 (6,4)	8 (10,5)
	Obesidade Grau II	1 (3,5)	3 (6,4)	4 (5,3)
	Ni ^a	3 (10,3)	3 (6,4)	6 (7,9)
Tabagista	Sim	4 (13,8)	3 (6,4)	7 (9,2)
	Não ^b	23 (79,3)	33 (70,2)	56 (73,7)
	Ni	2 (6,9)	11 (23,4)	13 (17,1)
Etílista	Sim	6 (20,7)	3 (6,4)	9 (11,8)
	Não ^c	20 (69)	31 (66)	51 (67,1)
	Ni	3 (10,3)	13 (27,6)	16 (21,1)
Critério Clínico	Amsterdam I	16 (55,2)	0 (0)	16 (21,1)
	Amsterdam II	13 (44,8)	0 (0)	13 (17,1)
	Bethesda	0 (0)	47 (100)	47 (61,8)
Pólipos	Sim	11 (37,9)	15 (31,9)	26 (34,2)
	Não	18 (62,1)	32 (68,1)	50 (65,8)
Estadio Clínico	I	2 (6,9)	4 (8,5)	6 (7,9)
	II	5 (17,2)	8 (17)	13 (17,1)
	III	12 (41,4)	21 (44,7)	33 (43,4)
	IV	7 (24,1)	9 (19,1)	16 (21)
	Ni	3 (10,4)	5 (10,6)	8 (10,6)
Topologia	Reto baixo	14 (48,3)	17 (36,2)	31 (40,8)
	Reto médio	6 (20,7)	13 (27,7)	19 (25)
	Reto alto	3 (10,3)	5 (10,6)	8 (10,6)
	Retosigmóide	2 (6,9)	7 (14,9)	9 (11,8)
	Ni ^d	4 (13,8)	5 (10,6)	9 (11,8)
Linfonodos	Positivo	12 (41,4)	24 (51,1)	36 (47,4)
	Negativo	15 (51,7)	22 (46,8)	37 (48,7)
	Ni	2 (6,9)	1 (2,1)	3 (3,9)

Cont/ Tabela 1

	Característica	Grupo 1	Grupo 2	Total	
		N (%)	N (%)	N (%)	
Tratamento	Sem tratamento ^c	0 (0)	1 (2,1)	1 (1,3)	
	QT neo	1 (3,4)	0 (0)	1 (1,3)	
	QT neo + RT neo	1 (3,4)	0 (0)	1 (1,3)	
	QT neo+ Cirurgia	0 (0)	1 (2,1)	1 (1,3)	
	QT neo + RT neo + Cirurgia	1 (3,4)	4 (8,5)	5 (6,6)	
	Cirurgia	3 (10,3)	4 (8,5)	7 (9,2)	
	Cirurgia + QT adj	5 (17,2)	9 (19,1)	14 (18,4)	
	Cirurgia + QT adj + RT adj	4 (13,8)	9 (19,1)	13 (17,1)	
	QT neo + Cirurgia + QT adj	1 (3,4)	2 (4,3)	3 (3,9)	
	RT neo + Cirurgia + QT adj	2 (6,9)	0 (0)	2 (2,6)	
	RT neo + Cirurgia + QT adj + RT adj	1 (3,4)	0 (0)	1 (1,3)	
	QT neo + RT neo + Cirurgia + QT adj	10 (34,5)	13 (27,7)	23 (30,3)	
	Completo ^f	0 (0)	4 (8,5)	4 (5,3)	
Invasão	Linfática	1 (3,4)	3 (6,4)	4 (5,3)	
	Perineural	2 (6,9)	10 (21,3)	12 (15,8)	
	Linfática + Perineural	3 (10,3)	2 (4,3)	5 (6,6)	
	Sanguínea + Perineural	2 (6,9)	1 (2,1)	2 (2,6)	
	Sanguínea + Linfática	0 (0)	1 (2,1)	1 (1,3)	
	Sanguínea + Linfática + Perineural	0 (0)	2 (4,3)	2 (2,6)	
	Não Ni ^g	19 (65,5)	26 (55,3%)	46 (60,5)	
Diagnóstico	Positivo	7 (24,1)	9 (19,1)	16 (21)	
	Negativo	22 (75,9)	38 (80,9)	60 (79)	
	Seguimento	Positivo	10 (34,5)	17 (36,2)	27 (36)
		Negativo	19 (65,5)	30 (63,8)	49 (64)
		Follow up	Vivo sem doença	15 (51,7)	26 (55,3%)
Vivo com doença	5 (17,2)		8 (17)	13 (17,1)	
Óbito pela doença	9 (31)		13 (27,7)	22 (28,9%)	

Legenda: N: Número amostral; Ni: Não Informado; QT: Quimioterapia; neo: neoadjuvante; RT: Radioterapia; adj: adjuvante. ^aNo momento da admissão os pacientes já haviam sido tratados em outra instituição. ^bSeis pacientes ex-tabagistas (G1: 3, G2: 3). ^cUm paciente do Grupo 1 deixou de consumir bebidas alcólicas quatro anos antes do diagnóstico. ^dNo prontuário não existe informação da distância entre o tumor e a borda anal. ^eFoi realizado colonoscopia com remoção de 95% da lesão. ^fQT neo + RT neo + Cirurgia + QT adj + RT adj. ^gTrês pacientes foram admitidos já operados e sem informação completa do anatomo-patológico e um paciente do Grupo 2 não passou por cirurgia.

5.1 ANÁLISE DOS DADOS DE SEQUENCIAMENTO

O sequenciamento realizado foi do tipo *paired-end*, o qual permite sequenciar as duas extremidades de um fragmento, gerando dados sequenciais que possibilitam um melhor alinhamento das sequências ao genoma referência. A cobertura média das regiões de interesse para cada uma das amostras sequenciadas variou de 144.663 a 573.299 no Grupo 1 e de 129.632 a 582.881 no Grupo 2 (Apêndices 1 e 2). Foi possível observar uma média de 98% e 99% das bases com cobertura igual ou superior a 30x, e de 90% e 93% das bases com cobertura igual ou superior a 100x em todas as regiões e todas as amostras dos Grupos 1 e 2, respectivamente, exceto para a amostra A17.

Sessenta e sete (Grupo 1: 26, Grupo 2: 41) dos 76 indivíduos sequenciados para o painel de 93 genes apresentaram 153 variantes germinativas em 65 genes, e nove pacientes (Grupo 1: 3 pacientes e Grupo 2: 6 pacientes) não apresentaram alterações para os genes testados. As alterações encontradas por paciente para os Grupos 1 e 2 estão apresentadas nos Apêndices 4 e 5, respectivamente.

No total foram identificadas sete variantes patogênicas (cinco *stop gain* e duas *frameshift*), seis *likely*-patogênicas (uma *stop gain* e cinco *missense*) e 140 de significado incerto (uma *stop gain*, uma *stop lost*, uma *inframe deletion*, cinco *frameshift*, três intergênicas, seis sinônimas, 24 em regiões *3 prime UTR/5 prime UTR* e 99 *missense*). A Figura 4 apresenta a frequência de variantes classificadas como patogênicas, *likely*-patogênicas e de significado incerto, e o tipo de variantes encontradas nos pacientes com câncer de reto.

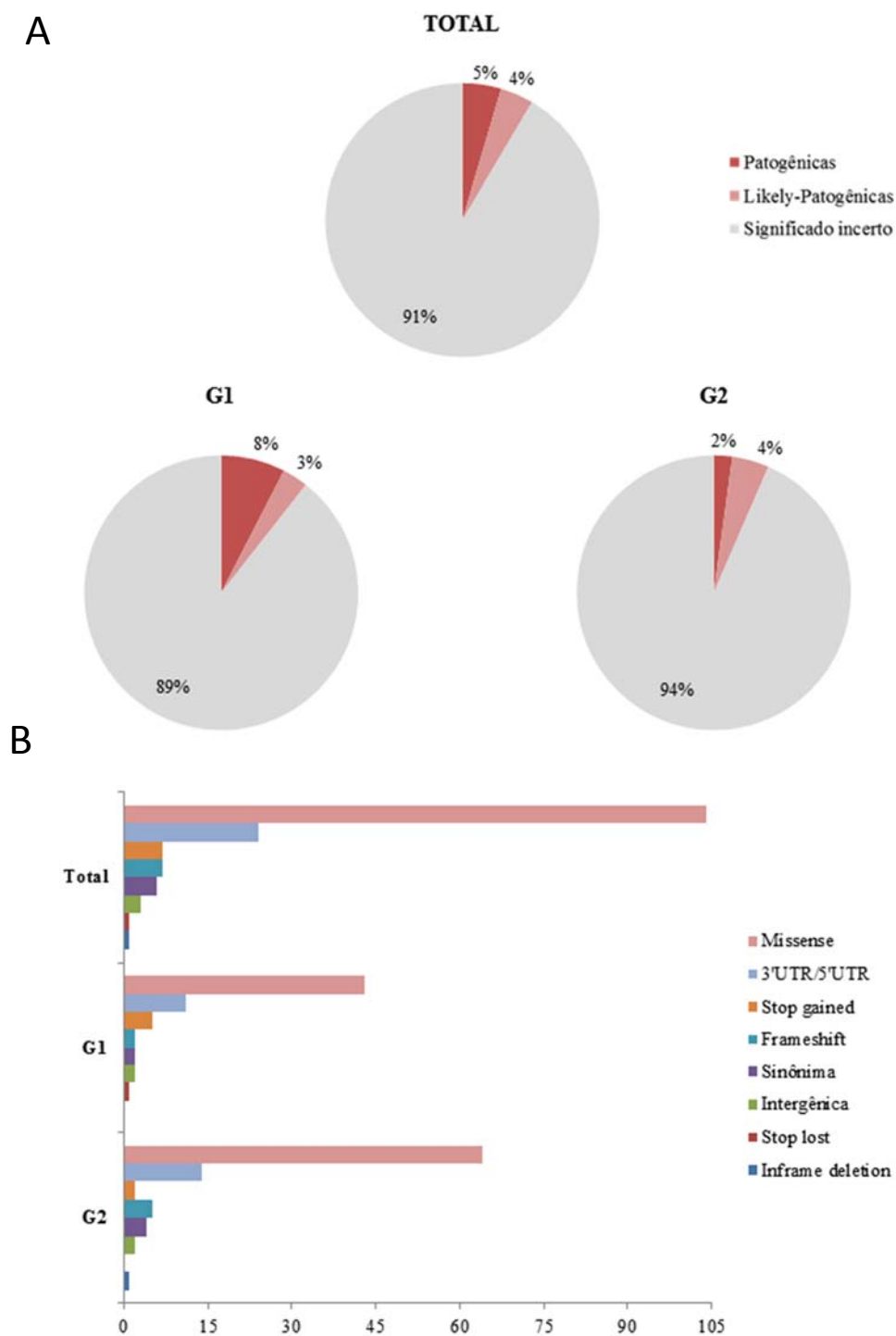


Figura 4 - A. Frequência de variantes classificadas como patogênicas, *likely*-patogênicas e de significado incerto em pacientes com câncer de reto. **B.** Tipo de variantes identificadas em pacientes com câncer de reto. G1: pacientes com câncer de reto classificados pelos critérios de Amsterdam I/II (Grupo 1); G2: pacientes com câncer de reto diagnosticados em idade jovem (igual ou inferior a 40 anos)(Grupo 2).

Na distribuição por grupos foram observadas 66 variantes no Grupo 1 envolvendo 40 genes em 26 pacientes (Tabela 2; Apêndice 3) enquanto no Grupo 2 foram identificadas 92 variantes em 51 genes de 41 pacientes (Tabela 3; Apêndice 4). Em geral, as variantes patogênicas encontradas em pacientes com câncer de reto alteram o término da transcrição (*stop gain*, Grupo 1: 4 e Grupo 2: 1) e o quadro de leitura (*frameshift*, Grupo 1: 1 e Grupo 2: 1), e estas variantes consequentemente produzem um produto proteico alterado. Variantes *likely*-patogênicas foram principalmente determinadas por alterações *missense* (Grupo 1: 2 e Grupo 2: 3), as quais são capazes de substituir um par de bases por outro que codifica um aminoácido diferente do original podendo resultar em uma proteína com função alterada e *stop gain* (Grupo 2: 1), esta alteração pode resultar em uma proteína truncada. Dentre as variantes de significado incerto em pacientes com câncer de reto foram mais frequentes as alterações *missense* (Grupo 1: 41 e Grupo 2: 61) e em regiões transcritas porém não traduzidas nas extremidades 5'-3' (*5'UTR/3'UTR*, Grupo 1: 11 e Grupo 2: 14). O tipo de variante identificada em cada grupo de acordo com a classificação para patogenicidade está representada na Figura 5.

Foram identificadas 61 variantes exclusivas do Grupo 1 e 87 do Grupo 2. Cinco variantes de significado incerto (uma *5'UTR*, uma intergênica e três *missense*) foram encontradas em pacientes de ambos os grupos (em azul nas Tabelas 2 e 3).

Tabela 2 - Dados resultantes da análise de sequenciamento em 29 pacientes com CaRe e história familiar de CCR (Grupo 1).

<i>Gene</i>	<i>Classificação</i>	<i>Região</i>	<i>Tipo de variante</i>	<i>SNP</i>	<i>Troca Base</i>	<i>Troca Aminoácido</i>	<i>dbNSFP</i>	<i>CASO</i>
<i>ABCG2</i>	<i>VUS</i>	<u>4:89018717</u>	<i>Missense</i>		<i>c.1535C>G</i>	<i>p.Thr512Ser</i>	2/6	A2
<i>ALK</i>	<i>VUS</i>	<u>2:29917796</u>	<i>Missense</i>	<u>rs572340007</u>	<i>c.872G>A</i>	<i>p.Arg291His</i>	3 de 6	A28
<i>APC</i>	<i>VUS</i>	<u>5:112174234</u>	<i>Frameshift</i>		<i>c.2942_2943insTA</i>	<i>p.Ser982Thrfs*24</i>	.	A4
	<i>VUS</i>	<u>5:112073598</u>	<i>5 prime UTR</i>		<i>c.-43A>C</i>	.	.	A10, A15
<i>AR</i>	<i>VUS</i>	<u>X:66765796</u>	<i>Missense</i>	<u>rs773305418</u>	<i>c.808G>C</i>	<i>p.Ala270Pro</i>	6 de 6	A22
	<i>VUS</i>	<u>X:66946904</u>	<i>3 prime UTR</i>		<i>c.*3221A>C</i>	.	.	A19
<i>ATM</i>	<i>Patogênica</i>	<u>11:108160395</u>	<i>Stop gained</i>		<i>c.4303A>T</i>	<i>p.Lys1435Ter</i>	2/6	A1
	<i>VUS</i>	<u>11:108160506</u>	<i>Missense</i>		<i>c.4414T>G</i>	<i>p.Leu1472Val</i>	4/6	A4
	<i>VUS</i>	<u>11:108225591</u>	<i>Missense</i>		<i>c.8840C>A/c.640+31056G>T</i>	<i>p.Thr2947Asn</i>	4/6	A8
	<i>VUS</i>	<u>11:108121787</u>	<i>Missense</i>	<u>rs35963548</u>	<i>c.1595G>A</i>	<i>p.Cys532Tyr</i>	5 de 6	A27
<i>BRCA1</i>	<i>VUS</i>	<u>11:108122625</u>	<i>Missense</i>	.	<i>c.1669A>G</i>	<i>p.Met557Val</i>	0 de 6	A28
	<i>VUS</i>	<u>17:41223202</u>	<i>Missense</i>		<i>c.4729T>C</i>	<i>p.Ser1577Pro</i>	2/6	A5
	<i>VUS</i>	<u>17:41246794</u>	<i>Missense</i>		<i>c.754C>T</i>	<i>p.Arg252Cys</i>	4/6	A9
<i>BRCA2</i>	<i>Patogênica</i>	<u>13:32936673</u>	<i>Frameshift</i>		<i>c.7819delA</i>	<i>p.Thr2607Leufs*41</i>	.	A6
	<i>VUS</i>	<u>13:32936791</u>	<i>Missense</i>		<i>c.7937G>A</i>	<i>p.Cys2646Tyr</i>	5/6	A2
	<i>VUS</i>	<u>13:32953641</u>	<i>Missense</i>	<u>rs398122716</u>	<i>c.8942A>G</i>	<i>p.Glu2981Gly</i>	2 de 6	A26
<i>BRIP1</i>	<i>VUS</i>	<u>17:59926582</u>	<i>Missense</i>		<i>c.415T>G</i>	<i>p.Ser139Ala</i>	3/6	A9, A26
<i>CCND1</i>	<i>VUS</i>	<u>11:69465941</u>	<i>Missense</i>		<i>c.779G>A</i>	<i>p.Arg260His</i>	5/6	A15
<i>CHEK2</i>	<i>VUS</i>	<u>22:29095872</u>	<i>Missense</i>		<i>c.962A>C</i>	<i>p.Glu321Ala</i>	5/6	A9
<i>EGFR</i>	<i>VUS</i>	<u>7:55211083</u>	<i>Missense</i>		<i>c.326G>C</i>	<i>p.Gly109Ala</i>	6/6	A7
	<i>VUS</i>	<u>7:55270292</u>	<i>Missense</i>		<i>c.3245T>G</i>	<i>p.Ile1082Arg</i>	1/6	A9
	<i>VUS</i>	<u>7:55221825</u>	<i>Missense</i>		<i>c.869C>T</i>	<i>p.Thr290Ile</i>	3/6	A11
<i>EPCAM</i>	<i>VUS</i>	<u>2:47601029</u>	<i>Missense</i>		<i>c.267G>C</i>	<i>p.Gln89His</i>	4/6	A12
	<i>VUS</i>	<u>2:47604198</u>	<i>Missense</i>	.	<i>c.537A>T</i>	<i>p.Lys179Asn</i>	4 de 6	A24
<i>ERBB3</i>	<i>VUS</i>	<u>12:56480392</u>	<i>Missense</i>	.	<i>c.499G>A</i>	<i>p.Val167Met</i>	4 de 6	A24
<i>EZH2</i>	<i>VUS</i>	<u>7:148523610</u>	<i>Sinônima</i>	.	<i>c.843T>C</i>	<i>p.Phe281=</i>	.	A22

Cont/ Tabela 2

<i>Gene</i>	<i>Classificação</i>	<i>Região</i>	<i>Tipo de variante</i>	<i>SNP</i>	<i>Troca Base</i>	<i>Troca Aminoácido</i>	<i>dbNFSP</i>	<i>CASO</i>
<i>FGF1</i>	<i>VUS</i>	5:141993722	<i>5 prime UTR</i>		<i>c.-30G>A</i>	.	.	<i>A10</i>
<i>FGFR1</i>	<i>VUS</i>	8:38285476	<i>Missense</i>		<i>c.584A>G</i>	<i>p.Lys195Arg</i>	2/6	<i>A15</i>
<i>FLT1</i>	<i>VUS</i>	13:29069276	<i>Intergênica</i>		.	.	.	<i>A7</i>
<i>FLT3</i>	<i>VUS</i>	13:28602329	<i>Missense</i>	rs372303125	<i>c.2039C>T</i>	<i>p.Ala680Val</i>	5 de 6	<i>A29</i>
	<i>VUS</i>	13:28609751	<i>Missense</i>		<i>c.1478G>A</i>	<i>p.Gly493Glu</i>	4/6	<i>A14</i>
<i>FLT4</i>	<i>VUS</i>	5:180038461	<i>Missense</i>		<i>c.3556A>G</i>	<i>p.Met1186Val</i>	0/6	<i>A11</i>
	<i>VUS</i>	5:180047996	<i>Missense</i>	.	<i>c.2179G>A</i>	<i>p.Ala727Thr</i>	2 de 6	<i>A27</i>
<i>GALNT12</i>	<i>VUS</i>	9:101611292	<i>Missense</i>		<i>c.1664C>T</i>	<i>p.Ser555Leu</i>	0/6	<i>A10</i>
<i>GNAQ</i>	<i>VUS</i>	9:80336116	<i>3 prime UTR</i>		<i>c.*123G>A</i>	.	.	<i>A14</i>
<i>HGF</i>	<i>VUS</i>	7:81399520	<i>Intergênica</i>		.	.	.	<i>A2</i>
<i>IGF1R</i>	<i>VUS</i>	15:99500763	<i>3 prime UTR</i>		<i>c.*95 *97delCCT</i>	.	.	<i>A9</i>
<i>JAK1</i>	<i>VUS</i>	1:65321324	<i>Missense</i>		<i>c.1516C>T</i>	<i>p.Arg506Cys</i>	1/6	<i>A10</i>
	<i>VUS</i>	1:65306993	<i>Missense</i>		<i>c.2584G>A</i>	<i>p.Ala862Thr</i>	0/6	<i>A14</i>
<i>JUN</i>	<i>VUS</i>	1:59248085	<i>Missense</i>		<i>c.658C>G</i>	<i>p.Pro220Ala</i>	5/6	<i>A14</i>
<i>KDM4C</i>	<i>VUS</i>	9:6805732	<i>Missense</i>		<i>c.278C>G</i>	<i>p.Ala93Gly</i>	2/6	<i>A19</i>
	<i>VUS</i>	9:6990438	<i>Missense</i>	rs771391567	<i>c.1700C>T</i>	<i>p.Thr567Ile</i>	2 de 6	<i>A28</i>
<i>KIT</i>	<i>VUS</i>	4:55606760	<i>3 prime UTR</i>		<i>c.*2037G>A</i>	.	.	<i>A14</i>
<i>KRAS</i>	<i>VUS</i>	12:25359076	<i>3 prime UTR</i>		<i>c.*3653A>G</i>	.	.	<i>A3</i>
<i>MLH3</i>	<i>VUS</i>	14:75483787	<i>Stop lost</i>		<i>c.4360T>C</i>	<i>p.Ter1454ArgextTer18</i>	0/6	<i>A2</i>
<i>MSH2</i>	<i>Patogênica</i>	2:47690227	<i>Stop gained</i>		<i>c.1444A>T</i>	<i>p.Arg482Ter</i>	2/6	<i>A1</i>
	<i>Patogênica</i>	2:47702372	<i>Stop gained</i>		<i>c.1968C>G</i>	<i>p.Tyr656Ter</i>	2/6	<i>A9</i>
	<i>Patogênica</i>	2:47703652	<i>Stop gained</i>	rs587779139	<i>c.2152C>T</i>	<i>p.Gln718Ter</i>	2 de 6	<i>A22</i>
	<i>Likely-Patogênica</i>	2:47637384	<i>Missense</i>		<i>c.518T>G</i>	<i>p.Leu173Arg</i>	6/6	<i>A19</i>
	<i>VUS</i>	2:47710068	<i>Stop gained</i>		<i>c.2785C>T</i>	<i>p.Arg929Ter</i>	2/6	<i>A14</i>
<i>MTHFR</i>	<i>VUS</i>	1:11852412	<i>Missense</i>		<i>c.1555C>T</i>	<i>p.Arg519Cys</i>	4/6	<i>A7, A8</i>
	<i>VUS</i>	1:11849417	<i>Missense</i>		<i>c.4264A>G/ c.*1320T>C</i>	<i>p.Lys1422Glu,.</i>	0/6	<i>A15</i>

Cont/ Tabela 2

<i>Gene</i>	<i>Classificação</i>	<i>Região</i>	<i>Tipo de variante</i>	<i>SNP</i>	<i>Troca Base</i>	<i>Troca Aminoácido</i>	<i>dbNFSP</i>	<i>CASO</i>
<i>NOTCH1</i>	<i>Likely-Patogênica</i>	<u>9:139405141</u>	<i>Missense</i>		<i>c.2704C>T</i>	<i>p.Arg902Cys</i>	5/6	<i>A14</i>
	<i>VUS</i>	<u>9:139417590</u>	<i>Missense</i>		<i>c.454G>A</i>	<i>p.Gly152Ser</i>	6/6	<i>A16</i>
<i>POLD1</i>	<i>VUS</i>	<u>19:50919923</u>	<i>Missense</i>	<u>rs767795037</u>	<i>c.3010G>A</i>	<i>p.Ala1004Thr</i>	3 de 6	<i>A22</i>
<i>POLE</i>	<i>VUS</i>	<u>12:133219838</u>	<i>Missense</i>	<u>rs142508245</u>	<i>c.4523G>A</i>	<i>p.Arg1508His</i>	2 de 6	<i>A26</i>
	<i>VUS</i>	<u>12:133226046</u>	<i>Missense</i>		<i>c.3851G>A</i>	<i>p.Arg1284Gln</i>	1/6	<i>A19</i>
<i>PTEN</i>	<i>VUS</i>	<u>10:89720731</u>	<i>Missense</i>		<i>c.882T>G</i>	<i>p.Ser294Arg</i>	3/6	<i>A10</i>
	<i>VUS</i>	<u>10:89727452</u>	<i>3 prime UTR</i>		<i>c.*2223G>T</i>	.	.	<i>A11</i>
	<i>VUS</i>	<u>10:89725995</u>	<i>3 prime UTR</i>	.	<i>c.*766G>A</i>	.	.	<i>A28</i>
<i>RAD51B</i>	<i>VUS</i>	<u>14:69149657</u>	<i>Missense</i>	<u>rs532374150</u>	<i>c.1040A>G</i>	<i>p.Gln347Arg</i>	.	<i>A20</i>
<i>RET</i>	<i>VUS</i>	<u>10:43609990</u>	<i>Missense</i>	<u>rs77711105</u>	<i>c.1942G>A</i>	<i>p.Val648Ile</i>	2 de 6	<i>A21</i>
	<i>VUS</i>	<u>10:43624328</u>	<i>3 prime UTR</i>	.	<i>c.*611C>A</i>	.	.	<i>A23</i>
<i>STK11</i>	<i>VUS</i>	<u>19:1228315</u>	<i>3 prime UTR</i>		<i>c.*740A>G</i>	.	.	<i>A13</i>
<i>VEGFA</i>	<i>VUS</i>	<u>6:43748538</u>	<i>Sinônima</i>		<i>c.1032C>T</i>	<i>p.Ser344=</i>	.	<i>A19</i>
<i>XRCC2</i>	<i>VUS</i>	<u>7:152346307</u>	<i>Missense</i>		<i>c.263A>G</i>	<i>p.Asp88Gly</i>	5/6	<i>A3</i>

Legenda: SNP: *Single Nucleotide Polymorphism*; dbNFSP: *Database for nonsynonymous functional SNPs' predictions*; VUS: *Variant of Uncertain Significance*; Ht: Heterozigoto; Hm: Homozigoto. **Em azul**, variantes presentes nos pacientes dos Grupos 1 e 2. Estão destacados em **negrito** os genes bem estabelecidos como associados à predisposição ao CCR.

Tabela 3 - Dados resultantes da análise de sequenciamento em 47 pacientes com CaRe em idade jovem (Grupo 2).

<i>Gene</i>	<i>Classificação</i>	<i>Região</i>	<i>Tipo de variante</i>	<i>SNP</i>	<i>Troca Base</i>	<i>Troca Aminoácido</i>	<i>dbNFSP</i>	<i>CASO</i>
<i>ABCC1</i>	<i>VUS</i>	<u>16:16196490</u>	<i>Missense</i>	<u>rs751066573</u>	<i>c.2651C>T</i>	<i>p.Thr884Met</i>	2 de 6	B3
<i>ALK</i>	<i>VUS</i>	<u>2:29754808</u>	<i>Missense</i>	.	<i>c.1127T>C</i>	<i>p.Leu376Pro</i>	2 de 6	B35
	<i>VUS</i>	<u>2:29416695</u>	<i>Missense</i>	.	<i>c.4258G>A</i>	<i>p.Gly1420Arg</i>	1 de 6	B38
<i>APC</i>	<i>VUS</i>	<u>5:112177911</u>	<i>Missense</i>	<u>rs758337476</u>	<i>c.6620C>T</i>	<i>p.Ser2207Leu</i>	4 de 6	B1
	<i>VUS</i>	<u>5:112175825</u>	<i>Missense</i>	<u>rs778699501</u>	<i>c.4534G>A</i>	<i>p.Asp1512Asn</i>	5 de 6	B23
	<i>VUS</i>	<u>5:112176527</u>	<i>Missense</i>	.	<i>c.5236A>G</i>	<i>p.Ile1746Val</i>	3 de 6	B31
	<i>VUS</i>	<u>5:112174471</u>	<i>Frameshift</i>	<u>rs587779352</u>	<i>c.3183 3187delACAAA</i>	<i>p.Gln1062Ter</i>	.	B36
<i>ARF1</i>	<i>VUS</i>	<u>1:228286563</u>	3 prime UTR	.	<i>c.*849A>G</i>	.	.	B14
<i>ATM</i>	<i>Likely-Patogênica</i>	<u>11:108205807</u>	<i>Missense</i>	<u>rs587782719</u>	<i>c.8122G>A/c.641-26009C>T</i>	<i>p.Asp2708Asn</i>	5 de 6	B14
	<i>VUS</i>	<u>11:108119823</u>	<i>Missense</i>	<u>rs56128736</u>	<i>c.1229T>C</i>	<i>p.Val410Ala</i>	4 de 6	B15
	<i>VUS</i>	<u>11:108224555</u>	<i>Missense</i>	<u>rs376676328</u>	<i>c.8734A>G/ c.640+32092T>C</i>	<i>p.Arg2912Gly</i>	6 de 6	B17, B21, B40
	<i>VUS</i>	<u>11:108139302</u>	<i>Missense</i>	<u>rs3218708</u>	<i>c.2804C>G</i>	<i>p.Thr935Arg</i>	0 de 6	B27
	<i>VUS</i>	<u>11:108143535</u>	<i>Missense</i>	<u>rs149911447</u>	<i>c.3240C>A</i>	<i>p.Asp1080Glu</i>	4 de 6	B36
	<i>VUS</i>	<u>11:108141988</u>	<i>Missense</i>	<u>rs139552233</u>	<i>c.2932T>C</i>	<i>p.Ser978Pro</i>	5 de 6	B39
<i>BARD1</i>	<i>VUS</i>	<u>2:215645330</u>	<i>Missense</i>	<u>rs749383704</u>	<i>c.1268A>G</i>	<i>p.Lys423Arg</i>	3 de 6	B38
<i>BMPRIA</i>	<i>VUS</i>	<u>10:88679051</u>	<i>Missense</i>	.	<i>c.991C>G</i>	<i>p.Leu331Val</i>	4 de 6	B22
<i>BRCA2</i>	<i>VUS</i>	<u>13:32911295</u>	<i>Missense</i>	<u>rs28897716</u>	<i>c.2803G>C</i>	<i>p.Asp935His</i>	0 de 6	B24
	<i>VUS</i>	<u>13:32930688</u>	<i>Missense</i>	<u>rs80358982</u>	<i>c.7559G>A</i>	<i>p.Arg2520Gln</i>	6 de 6	B28
	<i>VUS</i>	<u>13:32914809</u>	<i>Missense</i>	<u>rs56172926</u>	<i>c.6317T>C</i>	<i>p.Leu2106Pro</i>	0 de 6	B41
<i>CDKN2A</i>	<i>VUS</i>	<u>9:21971188</u>	<i>Missense</i>	<u>rs372266620</u>	<i>c.170C>A</i>	<i>p.Ala57Asp</i>	1 de 6	B46
<i>CHEK2</i>	<i>VUS</i>	<u>22:29092948</u>	<i>Missense</i>	<u>rs201206424</u>	<i>c.1036C>T</i>	<i>p.Arg346Cys</i>	5 de 6	B38
<i>CTNNB1</i>	<i>VUS</i>	<u>3:41281900</u>	3 prime UTR	.	<i>c.*1072dupA</i>	.	.	B19
	<i>VUS</i>	<u>3:41266972</u>	<i>Missense</i>	<u>rs369771822</u>	<i>c.643G>A</i>	<i>p.Ala215Thr</i>	2 de 6	B38
<i>DNMT3A</i>	<i>VUS</i>	<u>2:25470908</u>	<i>Missense</i>	<u>rs201882909</u>	<i>c.853G>A</i>	<i>p.Glu285Lys</i>	2 de 6	B3
<i>DNMT3B</i>	<i>VUS</i>	<u>20:31383232</u>	<i>Missense</i>	<u>rs35846833</u>	<i>c.1144C>T</i>	<i>p.Arg382Cys</i>	5 de 6	B38, B44

Cont/ Tabela 3

Gene	Classificação	Região	Tipo de variante	SNP	Troca Base	Troca Aminoácido	dbNFSP	CASO
EGFR	VUS	7:55268045	Missense	rs144496976	c.2885G>A	p.Arg962His	5 de 6	B4
	VUS	7:55211083	Missense	rs145113601	c.326G>C	p.Gly109Ala	6 de 6	B32
ERBB2	VUS	17:37871770	Missense	rs367606199	c.1294C>T	p.Arg432Trp	6 de 6	B39
ERBB3	VUS	12:56478852	Missense	rs778104039	c.308G>A	p.Arg103His	6 de 6	B2
ERBB4	VUS	2:213403353	Intergênica	rs142531677	.	.	.	B9
FGF1	VUS	5:142023866	5 prime UTR	rs182273775	c.-34-30140T>G	.	.	B1
	VUS	5:141993722	5 prime UTR	rs373156800	c.-30G>A	.	.	B11
FLT1	VUS	13:29005390	Missense	.	c.871A>G	p.Ile291Val	0 de 6	B15
	VUS	13:29069276	Intergênica	rs61763163	.	.	.	B32
	VUS	13:28964202	Missense	rs374335323	c.1700C>T	p.Pro567Leu	5 de 6	B7
FLT3	VUS	13:28644747	Missense	rs62636526	c.46G>C	p.Val16Leu	3 de 6	B3
GNAQ	VUS	9:80336149	3 prime UTR	.	c.*90A>G	.	.	B27
GREM1	VUS	15:33023086	Sinônima	rs754459001	c.195C>T	p.Gly65=	.	B28
HGF	VUS	7:81328496	3 prime UTR	.	c.*3401T>C	.	.	B23
HSPH1	VUS	13:31736159	Inframe deletion	.	c.71_73delAAG	p.Glu24del	.	B21, B40
	VUS	13:31712670	Missense	.	c.2250G>A	p.Met750Ile	2 de 6	B28
IDH1	VUS	2:209113206	Missense	rs762588599	c.301A>T	p.Asn101Tyr	5 de 6	B7
IGF1R	VUS	15:99507647	3 prime UTR	rs367849737	c.*6977_*6978del GA	.	.	B2
JUN	VUS	1:59249749	5 prime UTR	.	c.-1007A>C	.	.	B44
KDM4C	VUS	9:6986353	Missense	.	c.1364G>A	p.Cys455Tyr	0 de 6	B33
KRAS	VUS	12:25358257	3 prime UTR	.	c.*4468_*4472delAG TGA	.	.	B33
	VUS	12:25368390	Frameshift	.	c.451-5545dupA	.	.	B34
MLH1	Patogênica	3:37061926	Frameshift	rs63750853	c.1011delC	p.Asn338Ilefs*29	.	B30
MLH3	VUS	14:75513436	Missense	.	c.2923A>G	p.Asn975Asp	1 de 6	B9
	VUS	14:75513222	Missense	rs201303087	c.3137G>A	p.Arg1046Gln	1 de 6	B47

Cont/ Tabela 3

<i>Gene</i>	<i>Classificação</i>	<i>Região</i>	<i>Tipo de variante</i>	<i>SNP</i>	<i>Troca Base</i>	<i>Troca Aminoácido</i>	<i>dbNFSP</i>	<i>CASO</i>
MSH6	VUS	2:48026141	Missense	rs61753793	c.1019T>C	p.Phe340Ser	5 de 6	B20
	Patogênica	2:48028135	Stop gained	rs63750563	c.3013C>T	p.Arg1005Ter	2 de 6	B13
	VUS	2:48010445	Missense	rs267608026	c.73G>T	p.Ala25Ser	1 de 6	B34
	VUS	2:48027299	Missense	rs574358605	c.2177T>A	p.Phe726Tyr	4 de 6	B42
MTHFR	Likely-Patogênica	1:11862941	Stop gained	.	c.233C>G	p.Ser78Ter	2 de 6	B5, B7
	VUS	1:11852412	Missense	rs45496998	c.1555C>T	p.Arg519Cys	4 de 6	B32
MTOR	VUS	1:11186770	Sinônima	.	c.6435C>T	p.Asp2145=	.	B35
MUS81	VUS	11:65633325	Missense	rs774184394	c.1549G>A	p.Glu517Lys	5 de 6	B19
	VUS	11:65630625	Missense	rs765478661	c.695A>G	p.Lys232Arg	0 de 6	B30
	VUS	11:65629482	Missense	rs148465534	c.416G>A	p.Arg139Gln	1 de 6	B42
MUTYH	Likely-Patogênica	1:45797228	Missense	rs36053993	c.1187G>A	p.Gly396Asp	6 de 6	B8
	VUS	1:45797187	Frameshift	rs587780078	c.1227_1228dupGG	p.Glu410Glyfs*43	.	B15
	Likely-Patogênica	1:45798475	Missense	rs34612342	c.536A>G	p.Tyr179Cys	6 de 6	B15, B45
	VUS	1:45797869	Missense	.	c.902C>G	p.Pro301Arg	6 de 6	B45
NF1	VUS	17:29704362	3 prime UTR	rs548353495	c.*3189G>A	.	.	B20
	VUS	17:29549713	3 prime UTR	rs563448695	c.1722-749A>G	.	.	B25
	VUS	17:29677249	Frameshift	.	c.7308_7309delTA	p.His2436Glnfs*8	.	B39
	VUS	17:29552239	Missense	rs763901597	c.1972C>T	p.Leu658Phe	3 de 6	B43
NOTCH1	VUS	9:139396835	Missense	rs373841359	c.5273G>A	p.Arg1758His	5 de 6	B4
	VUS	9:139405221	Missense	.	c.2624T>C	p.Leu875Pro	3 de 6	B11
	VUS	9:139393351	Sinônima	.	c.6180G>A	p.Arg2060=	.	B19
	VUS	9:139407871	Missense	rs377286829	c.2326G>A	p.Val776Met	4 de 6	B44
PMS2	VUS	7:6018238	Missense	rs386833410	c.2264T>C	p.Ile755Thr	5 de 6	B46
POLD1	VUS	19:50905071	Missense	rs780604625	c.353C>T	p.Ser118Phe	0 de 6	B29
	VUS	19:50905322	Missense	rs3218750	c.530G>A	p.Arg177His	3 de 6	B37
POLE	VUS	12:133256230	Missense	rs755709875	c.431A>G	p.His144Arg	5 de 6	B2

Cont/ Tabela 3

Gene	Classificação	Região	Tipo de variante	SNP	Troca Base	Troca Aminoácido	dbNFSP	CASO
RAD50	VUS	<u>5:131953850</u>	Missense	<u>rs143189763</u>	c.3253A>G	p.Ile1085Val	3 de 6	B9, B34
	VUS	<u>5:131925474</u>	Missense	<u>rs752489625</u>	c.1397A>C	p.Gln466Pro	3 de 6	B11
RAD51B	VUS	<u>14:69149657</u>	Missense	<u>rs532374150</u>	c.1040A>G	p.Gln347Arg	.	B33, B47
	VUS	<u>14:68353784</u>	Missense	<u>rs28908168</u>	c.619G>T	p.Val207Leu	2 de 6	B45
RAD51C	VUS	<u>17:56774141</u>	Missense	<u>rs573992101</u>	c.492T>G	p.Phe164Leu	4 de 6	B17
RBI	VUS	<u>13:48954365</u>	Missense	.	c.1486G>T	p.Ala496Ser	5 de 6	B8
	VUS	<u>13:48937017</u>	Missense	<u>rs752342013</u>	c.785G>A	p.Arg262Gln	3 de 6	B47
RET	VUS	<u>10:43596003</u>	Missense	<u>rs779915615</u>	c.170G>A	p.Arg57Gln	0 de 6	B25
	VUS	<u>10:43607666</u>	Missense	<u>rs374461212</u>	c.1642G>A	p.Gly548Ser	4 de 6	B41
SCG5	VUS	<u>15:32972075</u>	Missense	<u>rs754073241</u>	c.335G>A	p.Gly112Glu	4 de 6	B22
STK11	VUS	<u>19:1223101</u>	Sinônima	<u>rs767565606</u>	c.1038C>T	p.Gly346=	.	B20
TYMS	VUS	<u>18:657686</u>	5 prime UTR	.	c.-42_-15del GCCGCGCCACT TCGCCTGCCT CCGTCCC/c.*34+129_*34+ 156delGAA GTGGCGC GGCGGGACGGAGG CAGGC	.	.	B20
VEGFA	VUS	<u>6:43754178</u>	3 prime UTR	.	c.*1879A>C	.	.	B13
	VUS	<u>6:43742118</u>	Missense	<u>rs138919899</u>	c.647A>T	p.Asn216Ile	2 de 6	B37
	VUS	<u>6:43752596</u>	3 prime UTR	<u>rs551692177</u>	c.*297G>A	.	.	B47
XRCC2	VUS	<u>7:152345950</u>	Missense	<u>rs61762969</u>	c.620A>G	p.Glu207Gly	1 de 6	B39

Legenda: SNP: Single Nucleotide Polymorphism; dbNFSP: Database for nonsynonymous functional SNPs' predictions; VUS: Variant of Uncertain Significance; Ht: Heterozigoto; Hm: Homozigoto. **Em azul**, variantes presentes nos pacientes dos Grupos 1 e 2. Estão destacados em **negrito** os genes bem estabelecidos como associados a predisposição ao CCR.

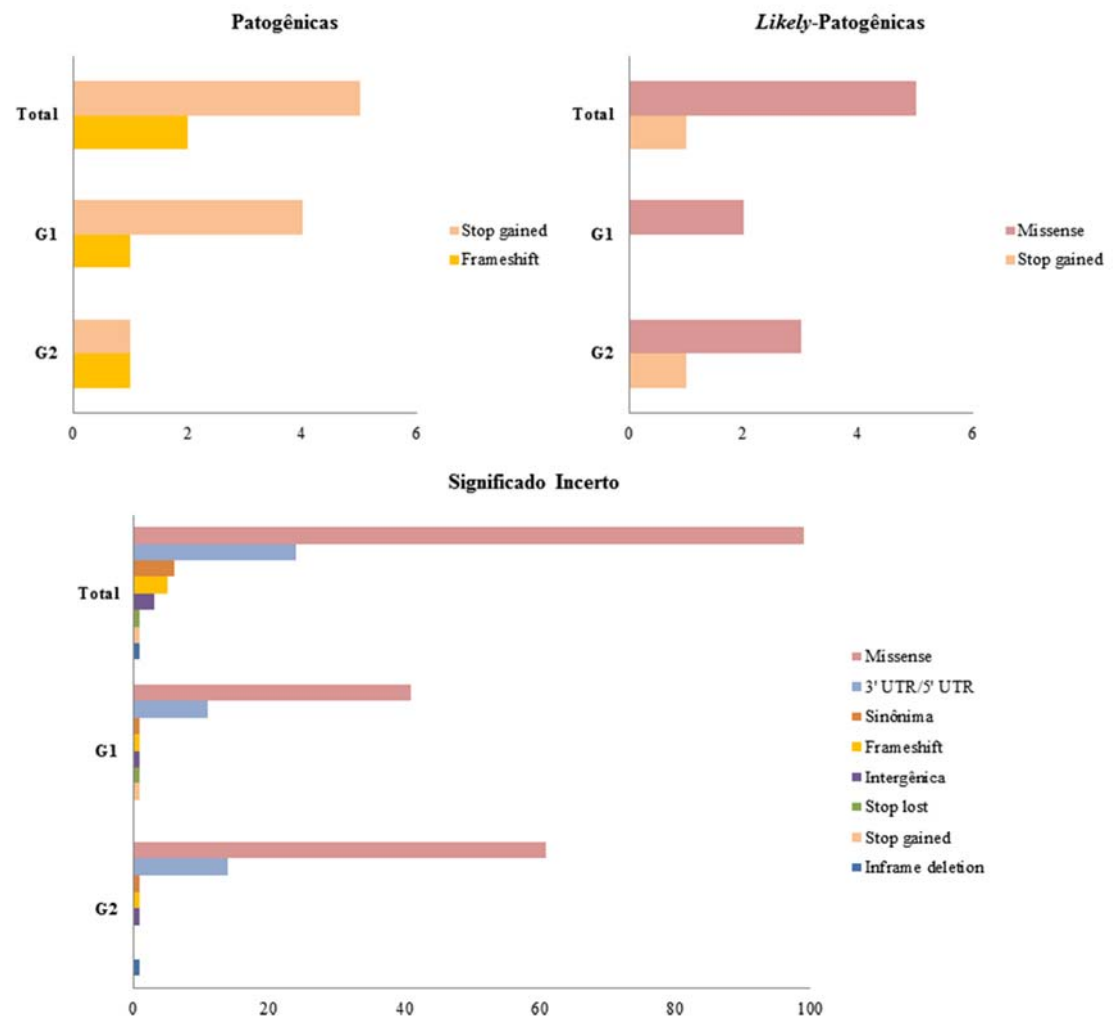


Figura 5 - Variantes encontradas entre os 76 pacientes com câncer de reto classificadas de acordo com a patogenicidade segundo os critérios do *American College of Medical Genetics and Genomics-ACMG* de 2018.

Em geral, os pacientes com câncer de reto apresentaram alta frequência de variantes nos genes *ATM* (13/67: 19%), seguido de *APC* (7/67: 10%), *BRCA2*, *NOTCH1* e *MTHFR* (6/67: 9% cada uma delas). Os pacientes do Grupo 1 apresentaram maior frequência de variantes em *ATM* e *MSH2* (5/26: 19%), seguidas de *APC*, *BRCA2*, *MTHFR*, *EGFR* e *PTEN* (3/26: 11,5%). No grupo 2 os genes comumente alterados foram *ATM* (8/41: 19,5%), seguido de *APC*, *NOTCH1*, *MSH6* e *NF1* (4/41:

10%). A descrição detalhada das variantes detectadas nos casos do Grupo 1 e 2 estão apresentadas nas Tabelas 2 e 3, respectivamente.

5.2 COMPARAÇÃO ENTRE AS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E MOLECULARES DOS PACIENTES INCLUÍDOS NO ESTUDO

As informações clínicas e resultados da expressão das proteínas MMR foram obtidas a partir da revisão de prontuários disponibilizados pela Instituição. A análise da expressão das proteínas MMR foi realizada como estratégia de rotina junto ao Departamento de Patologia da instituição em 36 tumores (A2, A3, A4, A6, A7, A10, A22, A25, A28, B4, B6, B8, B11, B12, B13, B17, B21, B22, B25, B26, B28, B29, B30, B31, B32, B33, B35, B37, B38, B39, B40, B41, B42, B43, B44 e B45) e em 40 casos este ensaio não foi realizado (detalhes nos Quadros 5 e 6). Quatro pacientes (A3, A22, B13 e B30) apresentaram tumores deficientes para a expressão das proteínas MMR (dMMR), dos quais três apresentaram variantes patogênicas em genes MMR. Um total de 32 pacientes apresentou tumores proficientes para as mesmas proteínas (pMMR).

No Grupo 1, 16 pacientes preencheram os critérios de Amsterdam I e 13 os critérios de Amsterdam II. Destes, apenas dois (A3 e A22, ambos Amsterdam II) pacientes apresentaram perda de expressão das proteínas MMR no tumor avaliado por IHQ. O tumor do paciente A22 revelou perda de expressão de MSH2 e MSH6, e o sequenciamento de genes alvo identificou uma variante patogênica em *MSH2* (c.2152C>T – *stop gain*). Embora o paciente A3 tenha apresentado perda de expressão das proteínas MLH1 e PMS2 no tumor, nenhuma alteração germinativa foi observada

por tNGS nestes genes. Um ensaio de metilação de *MLH1* foi também testado no sangue periférico revelando ausência de metilação para este gene.

Três pacientes do grupo 1 apresentaram com variantes patogênicas ou *likely*-patogênicas em *MSH2* (A1: c.1444A>T, *stop gained*, A9: c.1968C>G, *stop gained* e A19: c.518T>G). No entanto, não foi realizado o teste de MMR nos tumores destes pacientes. Sete pacientes (A2, A4, A6, A7, A10, A25 e A28) apresentaram tumores pMMR sem variantes germinativas identificadas por tNGS. Curiosamente, uma mutação patogênica foi identificada em *BRCA2* (c.7819delA, *frameshift*) no paciente A6. Os tumores de 20 dos 29 pacientes do grupo 1 não foram avaliados para expressão das proteínas MMR.

No Grupo 2 (pacientes ≤ 40 anos), foi observada a perda de expressão das proteínas MSH2 e MSH6 no tumor do paciente B13 e de MLH1 e PMS2 no tumor do paciente B30. Foram identificadas variantes patogênicas em *MSH6* (c.3013C>T – *stop gain*) e *MLH1* (c.1011delC - *frameshift*) nos pacientes B13 e B30, respectivamente. O paciente B30 não tem história de câncer na família enquanto o paciente B13 reportou câncer de estômago na avó paterna (63 anos) e na prima (48 anos), além de um tio paterno com câncer (não saber referir qual) aos 60 anos. Tumores pMMR foram observados em 25 pacientes (B4, B6, B8, B11, B12, B17, B21, B22, B25, B26, B28, B29, B31, B32, B33, B35, B37, B38, B39, B40, B41, B42, B43, B44, B45) e a expressão dessas proteínas não foi avaliada nos 20 tumores correspondentes aos demais pacientes.

5.2.1 Variantes com potencial efeito de risco para o desenvolvimento do câncer de reto

Além das variantes patogênicas ou *likely*-patogênicas supracitadas nos genes MMR e em *BRCA2*, foram observadas outras duas variantes em *ATM* (A1: c.4303A>T, *stop gain*) e *NOTCH1* (A14: c.2704C>T, *missense*) em pacientes do Grupo 1. No Grupo 2, além de variantes nos genes MMR, foram identificadas outras duas variantes *missense* em *MUTYH* (B8: c.1187G>A; B15 e B45: c.536A>G), uma *stop gain* em *MTHFR* (B5 e B7: c.233C>G) e uma *missense* em *ATM* (B14: c.8122G>A, c.641-26009C>T).

Vale ressaltar que as únicas alterações encontradas nos pacientes A1 (*ATM*: c.4303A>T; *MSH2*: c.1444A>T), A6 (*BRCA2*: c.7819delA) e B5 (*MTHFR*: c.233C>G) foram variantes patogênicas ou *likely*-patogênicas.

Em resumo, essa análise revelou que 10 pacientes (13%) apresentaram variantes em genes de alta penetrância, dois (3%) em genes de moderada penetrância e três (4%) em genes de baixa penetrância. Oito pacientes (11%) foram identificados com variantes germinativas em genes de predisposição ao câncer colorretal hereditário. Seis destes pacientes (A1, A9, A19, A22, B13 e B30) (8%), apresentaram variantes patogênicas ou *likely*-patogênicas nos genes MMR. Dentre estes, três pacientes apresentaram pólipos colônicos (A9: 2, A19: 1 e A22: 2) e dois (B13 e B30) não foram clinicamente classificados pelos critérios de Amsterdam I/II, embora molecularmente preenchessem os critérios para SL. Os pacientes B15 e B45 apresentaram duas variantes germinativas no gene *MUTYH* (uma *likely*-patogênica e uma de significado incerto), sendo observada uma variante em comum nos dois pacientes (c.536A>G, *likely*-patogênica). Esta variante esta classificada no ACMG

como *likely*-patogênica entretanto é considerada patogênica no CLINVAR e VARSOME (*The Human Genomics Community*: é biblioteca de dados públicos contendo bilhões de variantes e anotação de genes; <https://varsome.com/>). Estes pacientes apresentaram pólipos colônicos e a variante potencialmente patogênica em *MUTYH*. Desta forma, os pacientes B15 e B45 podem ser categorizados como pertencentes a síndrome da polipose associada ao *MUTYH* (MAP= 3%). Em adição, o paciente B8 apresentou uma variante *likely*-patogênica c.1187G>A em *MUTYH*, no entanto foi identificada apenas uma variante em *MUTYH* sugerindo que este paciente não é portador de MAP. Apenas uma variante *likely*-patogênica (c.1187G>A) no gene *MUTYH* foi identificada no paciente B8. O paciente A6 (quatro parentes do lado paterno com câncer colorretal) uma apresentou variante patogênica em *BRCA2* e não tem história de cancer de mama e ovário na família. Até o momento, ainda é controverso o papel de variantes patogênicas neste gene no CCR hereditário.

O espectro de variantes patogênicas ou *likely*-patogênicas encontradas em pacientes com câncer de reto e as síndromes hereditárias associadas a genes de alta penetrância identificados pelo estudo estão representados na Figura 6.

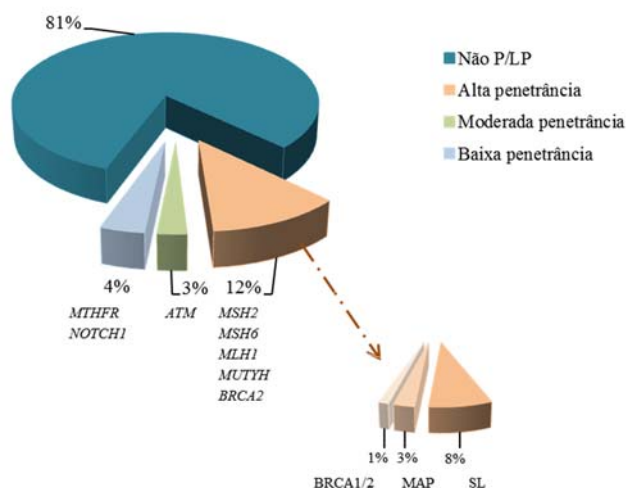


Figura 6 – Espectro de variantes patogênicas ou *likely*-patogênicas identificadas em pacientes com câncer de reto. Genes de alta penetrância: *MSH2*, *MSH6*, *MLH1*, *MUTYH*, *BRCA2*. Gene de moderada penetrância: *ATM*. Genes de baixa penetrância: *MTHFR* e *NOTCH1*.

Foram detectadas entre os casos-índice, variantes patogênicas e *likely*-patogênicas em genes associados às vias MMR e HR (*MSH2*, *ATM*, *BRCA2*, *MLH1*, *MSH6*), alterações associados ao risco de CCR (*MTHFR* e *MUTYH*) e múltiplos tumores (*NOTCH1*). Os genes com variantes patogênicas ou *likely*-patogênicas identificados pela análise de sequenciamento, com exceção de *MLH1*, também mostraram pelo menos uma variante de significado incerto (Tabelas 2 e 3).

Em adição, a análise permitiu identificar 25 novas variantes (uma *likely*-patogênica e 24 de significado incerto), as quais não foram detectadas em bancos de dados públicos (*gnomAD Genomes*, *gnomAD Exomes* e *ABRaOM*) ou reportadas anteriormente na literatura (Tabela 4).

Tabela 4 - Variantes germinativas identificadas pela metodologia de tNGS em pacientes com CaRe.

ID	Gene	Classificação	Região	Tipo de variante	Troca Base
A2	<i>BRCA2</i>	VUS	13:32936791	Missense	c.7937G>A
A3	<i>XRCC2</i>	VUS	7:152346307	Missense	c.263A>G
A4	APC	VUS	5:112174234	Frameshift	c.2942_2943insTA
A9	<i>BRCA1</i>	VUS	17:41246794	Missense	c.754C>T
A10	APC	VUS	5:112073598	5'UTR	c.-43A>C
A13	STK11	VUS	19:1228315	3'UTR	c.*740A>G
A14	<i>GNAQ</i>	VUS	9:80336116	3'UTR	c.*123G>A
	<i>KIT</i>	VUS	4:55606760	3'UTR	c.*2037G>A
A22	<i>EZH2</i>	VUS	7:148523610	Sinônima	c.843T>C
A24	<i>ERBB3</i>	VUS	12:56480392	Missense	c.499G>A
A27	<i>FLT4</i>	VUS	5:180047996	Missense	c.2179G>A
B8	<i>RBI</i>	VUS	13:48954365	Missense	c.1486G>T
B11	<i>NOTCH1</i>	VUS	9:139405221	Missense	c.2624T>C
B13	<i>VEGFA</i>	VUS	6:43754178	3'UTR	c.*1879A>C
B14	<i>ARF1</i>	VUS	1:228286563	3'UTR	c.*849A>G
B19	<i>NOTCH1</i>	VUS	9:139393351	Sinônima	c.6180G>A
B22	<i>BMPRIA</i>	VUS	10:88679051	Missense	c.991C>G
B23	<i>HGF</i>	VUS	7:81328496	3'UTR	c.*3401T>C
B27	<i>GNAQ</i>	VUS	9:80336149	3'UTR	c.*90A>G
B33	<i>KDM4C</i>	VUS	9:6986353	Missense	c.1364G>A
B35	<i>MTOR</i>	VUS	1:11186770	Sinônima	c.6435C>T
B38	<i>ALK</i>	VUS	2:29416695	Missense	c.4258G>A
B39	<i>NF1</i>	Likely-Patogênica	17:29677249	Frameshift	c.7308_7309delTA
B44	<i>JUN</i>	VUS	1:59249749	5'UTR	c.-1007A>C
B45	MUTYH	VUS	1:45797869	Missense	c.902C>G

Legenda: Em **negrito** estão os genes de predisposição ao CCR.

5.3 VARIANTES DE SIGNIFICADO INCERTO EM PACIENTES COM CÂNCER DE RETO

A maioria (91%) das variantes identificadas em nosso estudo é de significado incerto e as alterações comumente ocorreram pela substituição de um par de base. As VUS foram identificadas em 64 dos 76 pacientes deste estudo (Grupo 1: 24; Grupo 2:

40). A frequência dessas alterações está representada na Figura 4A e os tipos de variantes estão apresentados na Figura 5.

Algumas alterações importantes do tipo *stop lost*, *frameshift*, *stop gain* e *inframe deletion* foram identificadas em 12 pacientes (Grupo 1: 3 e Grupo 2: 9). Duas variantes de significado incerto do tipo *frameshift* foram identificadas no gene *APC* (A4: c.2942_2943insTA; B36: c.3183_3187delACAAA). O paciente A4 foi classificado pelos critérios de Amsterdam I já que CCR foi reportado na avó paterna (<50 anos), pai (64 anos), tia paterna (36 anos) e em dois tios paternos (<50 anos). Este paciente foi diagnosticado com mais de 50 pólipos colônicos. Embora o paciente B36 não tenha nenhum familiar com câncer, foram identificados múltiplos pólipos colônicos. Estes achados clínicos dão suporte para o significado clínico desta variante no gene *APC*. Além do gene *APC*, ambos os pacientes também apresentaram variantes de significado incerto do tipo *missense* em *ATM* (A4: c.4414T>G; B36: c.3240C>A) e estas duas alterações nestes dois genes foram as únicas identificadas nestes indivíduos. Em nosso estudo, avaliamos por sequenciamento do Sanger as amostras do paciente A4 e de seu irmão diagnosticado com pólipos colônicos aos 24 anos (A4-1). As alterações em *APC* (c.2942_2943insTA) e *ATM* (c.4414T>G) foram confirmadas no probando e identificadas em seu irmão (A4-1).

Dois pacientes (A2 e A14) apresentaram VUS em genes MMR. O caso A2 apresentou uma variante associada a perda do códon de parada (*stop lost*) em *MLH3* (c.4360T>C). Este paciente foi classificado pelo critério de Amsterdam I, não apresentou pólipos colônicos e o tumor foi pMMR (MSH2+, MSH6+, MLH1+ e PMS2+). O paciente A2 também apresentou variantes de significado incerto no gene *BRCA2* (c.7937G>A, *missense*) associado a predisposição hereditária ao câncer de

mama e ovário (A2 reportou ter uma prima materna com câncer de mama aos 38 anos, avó e duas tias maternas com CCR) e em genes não associados a predisposição ao câncer (*ABCG2*: c.1535C>G, *missense*; *HGF*: rs187388164, intergênica). O paciente A14 apresentou uma variante que resultou em ganho do códon de parada (*stop gained*) em *MSH2*: c.2785C>T. Este paciente foi classificado por Amsterdam I, não apresentou pólipos e não teve o tumor investigado para as proteínas MMR. O paciente A14 também apresentou uma variante *likely*-patogênica em *NOTCH1* (c.2704C>T), além de outras variantes de significado incerto em genes relacionados ao câncer como *JUN* (c.658C>G), *KIT* (c.*2037G>A), *JAK1* (c.2584G>A), *GNAQ* (c.*123G>A) e *FLT3* (c.1478G>A).

Uma variante que altera o quadro de leitura (*frameshift*) em *MUTYH* (c.1227_1228dupGG) foi detectada no paciente B45. Como descrito anteriormente, este paciente apresentou um espectro clínico de MAP, além de duas variantes em *MUTYH*, das quais uma é *likely*-patogênica. Este paciente (B45) também apresentou uma VUS *missense* em *RAD51B*. Dois pacientes (B21 e B40) foram identificados com a mesma variante que leva a perda de um códon inteiro (*inframe deletion*) em *HSPH1* (c.71_73delAAG). Interessantemente, B21 e B40 apresentaram uma outra única variante idêntica, a VUS *missense* em *ATM* (c.8734A>G/ c.640+32092T>C). Ambos os pacientes não apresentaram pólipos colônicos, tiveram tumores pMMR (B21: retosigmóide, B40: reto médio), foram diagnosticados em estágio avançado da doença (III e IV, respectivamente), e apresentaram metástase pulmonar e hepática ao seguimento clínico. No entanto ao passo que B21 reportou uma tia paterna com câncer de reto (56 anos) o paciente B40 não teve história de câncer na família. Essa variante no gene *ATM* (c.8734A>G/ c.640+32092T>C) foi também identificada no paciente

B17, o qual apresentou características clínicas bastante semelhantes aos pacientes B21 e B40 (não apresentou pólipos, teve tumor no reto médio pMMR, a doença foi diagnosticada em estágio III, apresentou metástase e recidiva ao seguimento clínico e não reportou casos de câncer na família).

Os pacientes B34 e B39 apresentaram outras duas VUS que alteram o quadro de leitura (*frameshift*) nos genes *KRAS* (c.451-5545dupA) e *NFI* (c.7308_7309delTA), respectivamente. O paciente B34 apresentou VUS em *MSH6* (c.73G>T, *missense*) e em *RAD50* (c.3253A>G, *missense*). Este paciente não apresentou pólipos, reportou uma tia com câncer de mama (45 anos) e não teve o tumor testado para as proteínas MMR. O paciente B39 apresentou outras três VUS *missense* nos genes *ATM* (c.2932T>C), *ERBB2* (c.1294C>T) e *XRCC2* (c.620A>G). Este paciente apresentou tumor pMMR, um pólipos colônico e nenhum caso de câncer na família.

5.3.1 Alterações compartilhadas entre pacientes não aparentados

Cada uma das variantes detectada no presente estudo foi investigada com o intuito de identificar genes de predisposição que podem contribuir para o risco de desenvolvimento de carcinomas de reto. A Tabela 5 apresenta todas as variantes compartilhadas nos probandos do nosso estudo e que não relataram qualquer parentesco entre eles.

Tabela 5 – Variantes compartilhadas em indivíduos não aparentados.

Gene	Classificação	Tipo de variante	Troca Base	Troca Aminoácido	dbSNP	ID
<i>APC</i>	VUS	5 prime UTR	c.-43A>C	.	.	A10, A15
<i>ATM</i>	VUS	Missense	c.8734A>G/ c.640+32092T>C	p.Arg2912Gly	6 de 6	B17, B21, B40
<i>BRIP1</i>	VUS	Missense	c.415T>G	p.Ser139Ala	3 de 6	A26, A9
<i>DNMT3B</i>	VUS	Missense	c.1144C>T	p.Arg382Cys	5 de 6	B38, B44
<i>EGFR</i>	VUS	Missense	c.326G>C	p.Gly109Ala	6 de 6	A7, B32
<i>FGF1</i>	VUS	5 prime UTR	c.-30G>A	.	.	B11, A10
<i>FLT1</i>	VUS	Intergênica	.	.	.	A7, B32
<i>HSPH1</i>	VUS	Inframe deletion	c.71_73delAAG	p.Glu24del	.	B21, B40
<i>MTHFR</i>	Likely-Patogênica	Stop gained	c.233C>G	p.Ser78Ter	2 de 6	B5, B7
	VUS	Missense	c.1555C>T	p.Arg519Cys	4 de 6	A7, A8, B32
<i>MUTYH</i>	Likely-Patogênica ^a	Missense	c.536A>G	p.Tyr179Cys	6 de 6	B15, B45
<i>RAD50</i>	VUS	Missense	c.3253A>G	p.Ile1085Val	3 de 6	B9, B34
<i>RAD51B</i>	VUS	Missense	c.1040A>G	p.Gln347Arg	.	A20, B33, B47

Legenda: Estão destacados em **negrito** os genes de predisposição ao CCR. ^aEssa variante é classificada como patogênica no CLINVAR e INTERVAR.

Além dos pacientes B5-B7, B15-B45, e B17-B21-B40 descritos previamente, os pacientes A7 e B32 compartilharam as mesmas alterações. Nestes dois pacientes (A7 e B32) foram identificadas três VUS germinativas idênticas incluindo uma no gene *MTHFR* (c.1555C>T – missense), no *EGFR* (c.326G>C – missense) e *FLT1* (rs61763163 – intergênica). O paciente A8 também apresentou a mesma variante no gene *MTHFR* (c.1555C>T – missense). Assim, a mesma variante no gene *MTHFR* foi detectada em três pacientes não aparentados.

Uma variante de significado incerto na região 5'UTR em *APC* (c.-43A>C) foi encontrada em dois pacientes do Grupo 1 (A10 e A15). O paciente A15 apresentou pólipos colônicos (<10) e não teve o tumor investigado para as proteínas MMR. Embora o paciente A10 não tenha apresentado pólipos intestinais, teve tumor pMMR e reportou história de pólipos em sua mãe. Casos de CCR e câncer renal foram reportados em ambas as famílias. Ambos os pacientes apresentaram outras variantes

de significado incerto em outros genes (A10 – *FGF1*: c.-30G>A, *GALNT12*: c.1664C>T, *JAK1*: c.1516C>T e *PTEN*: c.882T>G/ A15 – *CCND1*: c.779G>A, *FGFR1*: c.584A>G, *MTHFR*: c.4264A>G/ c.*1320T>C).

A variante em *FGF1* (c.-30G>A, 5'UTR) reportada no caso índice A10, também foi identificada no paciente B11. O paciente B11 não apresentou pólipos intestinais, teve tumor pMMR e reportou apenas um caso de câncer na família (tia materna: colo uterino).

Os pacientes B38 e B44 apresentaram a mesma variante *missense* de significado incerto no gene *DNMT3B* (c.1144C>T). Diversos membros da família materna do paciente B38 apresentaram história de câncer, enquanto nenhum caso de câncer foi relatado nos familiares do caso B44. Os pacientes não apresentaram pólipos colônicos, tiveram tumor pMMR e não apresentaram metástase no seguimento clínico. Também foram identificadas variantes de significado incerto em *ALK* (c.4258G>A), *BARD1* (c.1268A>G), *CHEK2* (c.1036C>T) e *CTNNB1* (c.643G>A) no paciente B38 e em *JUN* (c.-1007A>C) e *NOTCH1* (c.2326G>A) no paciente B44.

Uma variante *missense* detectada no gene *BRIP1* (c.415T>G) foi identificada nos pacientes A9 e A26. Ambos os pacientes tiveram pólipos no reto (A9: 2 e A26: 1) e apresentação da doença em estágio avançado (A9: III e A26: IV).

Uma VUS *missense* em *RAD50* (c.3253A>G) foi detectada em dois indivíduos do Grupo 2 (B9 e B34). Ambos os pacientes reportaram apenas um caso de câncer de mama na família (B9: irmã; B34: tia), não apresentaram pólipos colônicos e tiveram tumor no reto baixo.

Foi identificada a mesma VUS *missense* em *RAD51B* em três indivíduos não aparentados (A20, B33 e B47). O paciente A20 foi classificado por Amsterdam II e,

B33 e B47 eram jovens, mas todos reportaram casos de câncer na família. Os pacientes A20 e B47 apresentaram tumor em reto baixo, B33 teve tumor pMMR, e B47 tinha história de pólipos colônicos.

5.4 PACIENTES COM CÂNCER DE RETO APRESENTAM DEFICIÊNCIA NAS VIAS MMR E HR

O painel utilizado neste estudo permitiu avaliar genes que atuam no sistema das vias MMR e HR. O sequenciamento revelou variantes em todos os genes da via MMR (cinco variantes patogênicas, uma *likely*-patogênica e 14 VUS) e 13 genes da via HR (duas variantes patogênicas, uma *likely*-patogênica e 36 VUS) em pacientes com câncer de reto (Tabela 6).

Tabela 6 - Genes da via MMR e HR alterados em pacientes com câncer de reto.

<i>Gene</i>	<i>Classificação</i>	<i>Tipo de variante</i>	<i>Troca Base</i>	<i>Troca Aminoácido</i>	<i>dbNF SP</i>	<i>Caso</i>
<i>MLH1^a</i>	<i>Patogênica</i>	<i>Frameshift</i>	<i>c.1011delC</i>	<i>p.Asn338Ilefs*29</i>	-	<i>B30</i>
	<i>VUS</i>	<i>Missense</i>	<i>c.2923A>G</i>	<i>p.Asn975Asp</i>	1 de 6	<i>B9</i>
<i>MLH3^a</i>	<i>VUS</i>	<i>Stop lost</i>	<i>c.4360T>C</i>	<i>p.Ter1454ArgextTer18</i>	0 de 6	<i>A2</i>
	<i>VUS</i>	<i>Missense</i>	<i>c.3137G>A</i>	<i>p.Arg1046Gln</i>	1 de 6	<i>B47</i>
	<i>Patogênica</i>	<i>Stop gained</i>	<i>c.1444A>T</i>	<i>p.Arg482Ter</i>	2 de 6	<i>A1</i>
	<i>Patogênica</i>	<i>Stop gained</i>	<i>c.2152C>T</i>	<i>p.Gln718Ter</i>	2 de 6	<i>A22</i>
<i>MSH2^a</i>	<i>Patogênica</i>	<i>Stop gained</i>	<i>c.1968C>G</i>	<i>p.Tyr656Ter</i>	2 de 6	<i>A9</i>
	<i>Likely-Patogênica</i>	<i>Missense</i>	<i>c.518T>G</i>	<i>p.Leu173Arg</i>	6 de 6	<i>A19</i>
	<i>VUS</i>	<i>Stop gained</i>	<i>c.2785C>T</i>	<i>p.Arg929Ter</i>	2 de 6	<i>A14</i>
	<i>VUS</i>	<i>Missense</i>	<i>c.1019T>C</i>	<i>p.Phe340Ser</i>	5 de 6	<i>B20</i>
<i>MSH6^a</i>	<i>Patogênica</i>	<i>Stop gained</i>	<i>c.3013C>T</i>	<i>p.Arg1005Ter</i>	2 de 6	<i>B13</i>
	<i>VUS</i>	<i>Missense</i>	<i>c.73G>T</i>	<i>p.Ala25Ser</i>	1 de 6	<i>B34</i>
	<i>VUS</i>	<i>Missense</i>	<i>c.2177T>A</i>	<i>p.Phe726Tyr</i>	4 de 6	<i>B42</i>
<i>PMS2^a</i>	<i>VUS</i>	<i>Missense</i>	<i>c.2264T>C</i>	<i>p.Ile755Thr</i>	5 de 6	<i>B46</i>
	<i>VUS</i>	<i>Missense</i>	<i>c.3010G>A</i>	<i>p.Ala1004Thr</i>	3 de 6	<i>A22</i>
<i>POLD1^c</i>	<i>VUS</i>	<i>Missense</i>	<i>c.353C>T</i>	<i>p.Ser118Phe</i>	0 de 6	<i>B29</i>
	<i>VUS</i>	<i>Missense</i>	<i>c.530G>A</i>	<i>p.Arg177His</i>	3 de 6	<i>B37</i>

Cont/ Tabela 6

Gene	Classificação	Tipo de variante	Troca Base	Troca Aminoácido	dbNF SP	Caso
POLE ^c	VUS	Missense	c.431A>G	p.His144Arg	5 de 6	B2
	VUS	Missense	c.4523G>A	p.Arg1508His	2 de 6	A26
	VUS	Missense	c.3851G>A	p.Arg1284Gln	1 de 6	A19
ATM ^b	Patogênica	Stop gained	c.4303A>T	p.Lys1435Ter	2 de 6	A1
	Likely-Patogênica	Missense	c.8122G>A/c.641-26009C>T	p.Asp2708Asn	5 de 6	B14
	VUS	Missense	c.1229T>C	p.Val410Ala	4 de 6	B15
	VUS	Missense	c.8734A>G/ c.640+32092T>C	p.Arg2912Gly	6 de 6	B17, B21, B40
	VUS	Missense	c.4414T>G	p.Leu1472Val	4 de 6	A4
	VUS	Missense	c.8840C>A/c.640+31056G>T	p.Thr2947Asn	4 de 6	A8
	VUS	Missense	c.2804C>G	p.Thr935Arg	0 de 6	B27
	VUS	Missense	c.1595G>A	p.Cys532Tyr	5 de 6	A27
	VUS	Missense	c.3240C>A	p.Asp1080Glu	4 de 6	B36
	VUS	Missense	c.1669A>G	p.Met557Val	0 de 6	A28
BRCA1 ^b	VUS	Missense	c.2932T>C	p.Ser978Pro	5 de 6	B39
	VUS	Missense	c.1268A>G	p.Lys423Arg	3 de 6	B38
BRCA2 ^b	VUS	Missense	c.4729T>C	p.Ser1577Pro	2 de 6	A5
	VUS	Missense	c.754C>T	p.Arg252Cys	4 de 6	A9
BRCA2 ^b	Patogênica	Frameshift	c.7819delA	p.Thr2607Leufs*41	-	A6
	VUS	Missense	c.2803G>C	p.Asp935His	0 de 6	B24
	VUS	Missense	c.7937G>A	p.Cys2646Tyr	5 de 6	A2
	VUS	Missense	c.8942A>G	p.Glu2981Gly	2 de 6	A26
	VUS	Missense	c.7559G>A	p.Arg2520Gln	6 de 6	B28
	VUS	Missense	c.6317T>C	p.Leu2106Pro	0 de 6	B41
BRIP1 ^b	VUS	Missense	c.415T>G	p.Ser139Ala	3 de 6	A26, A9
CHEK2 ^b	VUS	Missense	c.1036C>T	p.Arg346Cys	5 de 6	B38
	VUS	Missense	c.962A>C	p.Glu321Ala	5 de 6	A9
MUS81 ^b	VUS	Missense	c.1549G>A	p.Glu517Lys	5 de 6	B19
	VUS	Missense	c.695A>G	p.Lys232Arg	0 de 6	B30
	VUS	Missense	c.416G>A	p.Arg139Gln	1 de 6	B42
RAD50 ^b	VUS	Missense	c.3253A>G	p.Ile1085Val	3 de 6	B9, B34
	VUS	Missense	c.1397A>C	p.Gln466Pro	3 de 6	B11
RAD51B ^b	VUS	Missense	c.1040A>G	p.Gln347Arg	-	A20, B33, B47
	VUS	Missense	c.619G>T	p.Val207Leu	2 de 6	B45
RAD51C ^b	VUS	Missense	c.492T>G	p.Phe164Leu	4 de 6	B17
XRCC2 ^b	VUS	Missense	c.263A>G	p.Asp88Gly	5 de 6	A3
	VUS	Missense	c.620A>G	p.Glu207Gly	1 de 6	B39

Legenda: ^a Genes associados a via MMR; ^b Genes associados a via HR; ^c Genes associados a via MMR e HR.

Foram identificados 18 pacientes (Grupo 1: 7; Grupo 2: 11) com variantes em genes da via MMR e 38 pacientes com variantes em genes da via HR (Grupo 1: 14;

Grupo 2: 24) (Figura 7). Estes resultados estão detalhados abaixo segundo o grupo a que pertencem.

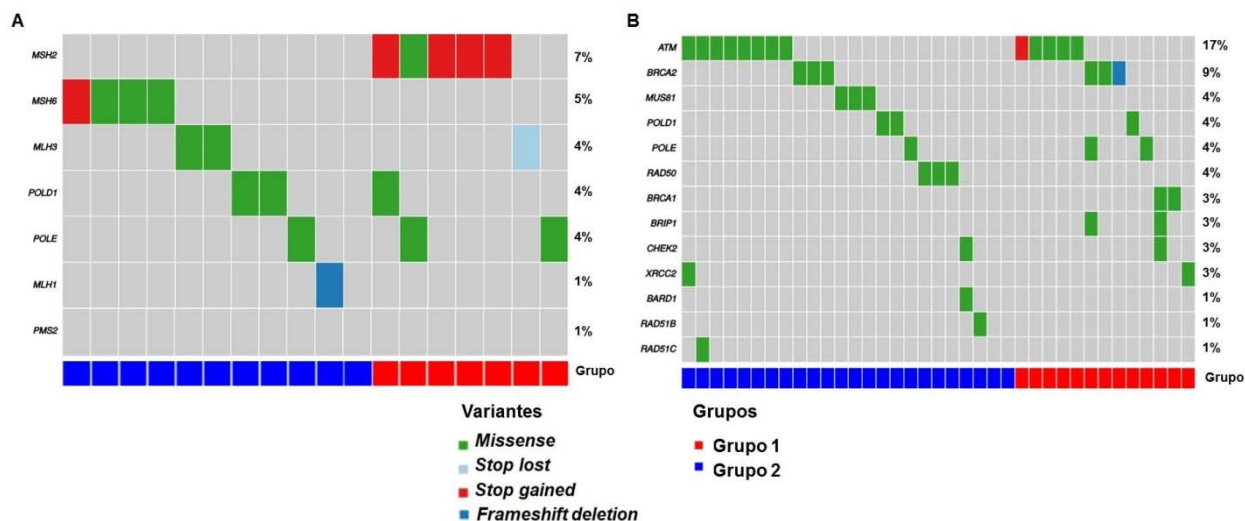


Figura 7 - Variantes germinativas em genes associados as vias (A) *mismatch repair* (MMR) e (B) recombinação homóloga (HR) em pacientes com câncer de reto. Foram identificadas variantes do tipo *missense*, *stop lost*, *stop gained* e *frameshift deletion*. A frequência (lado direito) representa a porcentagem do total de pacientes (76) que apresentaram alguma variante nos genes indicados.

No grupo 1 foram detectadas variantes em quatro genes (*MLH3*, *MSH2*, *POLD1* e *POLE*) da via MMR e nove (*ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *BRIP1*, *CHEK2*, *POLD1*, *POLE*, *RAD51B* e *XRCC2*) da via HR em pacientes com CaRe classificados pelos critérios de Amsterdam. No total, sete pacientes apresentaram variantes germinativas em genes da via MMR e 14 pacientes em genes da via HR. Os genes *MSH2* (5/26: 19%) e *ATM* (5/26: 19%) foram os mais frequentemente alterados das vias MMR e HR, respectivamente (Tabela 6, Figura 7).

No grupo 2 foram identificadas variantes nos genes *MLH1*, *MLH3*, *MSH6*, *PMS2*, *POLD1* e *POLE* da via MMR e em *ATM*, *BARD1*, *BRCA2*, *CHEK2*, *MUS81*, *POLD1*, *POLE*, *RAD50*, *RAD51B*, *RAD51C* e *XRCC2* da via HR em pacientes jovens

com CaRe. No total, 11 pacientes apresentaram variantes germinativas em genes da via MMR e 24 em genes da via HR. As variantes nos genes *ATM* (8/41: 19,5%) e *MSH6* (4/41: 10%) foram as mais frequentemente observadas nos pacientes do grupo 2 nos genes das vias HR e MMR, respectivamente (Tabela 6, Figura 7).

5.5 ASSOCIAÇÃO DOS ACHADOS COM CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS

Uma análise supervisionada foi realizada para investigar os genes frequentemente alterados em pacientes com CaRe e características clínicas e histopatológicas importantes associadas a doença (Figura 8).

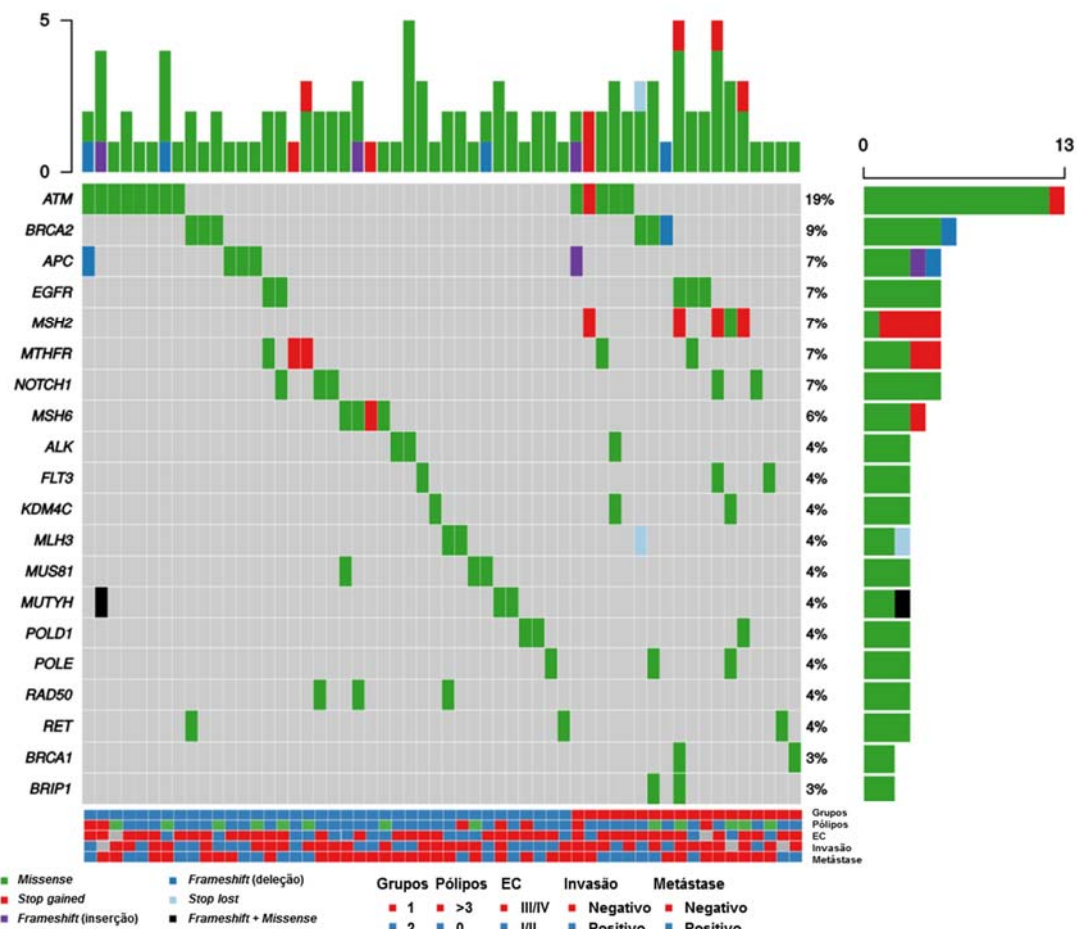


Figura 8 - Análise supervisionada para investigar os 20 genes frequentemente alterados em pacientes com CaRe e as características clínicas e histopatológicas associadas a doença. Cada linha representa um gene e cada coluna um paciente. A escala superior (0-5) representa o número de variantes encontrada por paciente e a escala ao lado esquerdo (0-13) representa o número de variantes encontradas por gene. EC: estágio clínico.

Para comparar os dados clínicos e histopatológicos foi realizada uma análise estatística agrupando as variantes identificadas em genes das vias MMR (20 variantes) e HR (39 variantes), e em genes associados ao CCR (*APC*: 6 e *MUTYH*: 4) (Tabela 7). Embora tenham sido encontradas variantes em outros genes previamente descritos como associados ao CCR (*BMPRIA*: 1, *CDKN2A*: 1, *EPCAM*: 2, *GALNT12*: 1, *GREM1*: 1, *MUTYH*: 4 e *STK11*: 2), eles não foram considerados nesta análise por estarem presentes em um pequeno número de casos. As características investigadas nesta análise foram: idade de diagnóstico, gênero, índice de massa corpórea (IMC),

etilismo, tabagismo, pólipos, estadiamento clínico (EC), metástase ao diagnóstico, topologia, invasão e metástase linfonodal.

Tabela 7 - Resultados do número de casos com variantes germinativas em genes associados a via MMR, HR e reportados em CCR (*APC* e *MUTYH*), associados com características clínico-patológicas dos pacientes com CaRe.

Características	N	MMR (%)	P	HR (%)	P	APC (%)	P	MUTYH (%)	P
Idade									
≤40 anos	71	18 (25,4)	0.331	36 (50,7)	1.0	6 (8,5)	0.392	3 (4,2)	1.0
>40 anos	5	0 (0)		2 (40)		1 (20)		0 (0)	
Gênero									
Feminino	41	9 (22)	0.701	18 (43,9)	0.250	3 (7,3)	0.697	2 (4,9)	1.0
Masculino	35	9 (25,7)		20 (57,1)		4 (11,4)		1 (2,9)	
IMC									
<25	38	8 (21,1)	0.933	21 (55,3)	0.337	3 (7,9)	0.695	2 (5,3)	0.496
≥25	32	7 (21,9)		14 (43,8)		4 (12,5)		0 (0)	
Etilismo									
Sim	9	3 (33,3)	0.678	5 (55,6)	1.0	2 (22,2)	0.281	0 (0)	1.0
Não	51	12 (23,5)		25 (49)		5 (9,8)		2 (3,9)	
Tabagismo									
Sim	7	2 (28,6)	0.667	5 (71,4)	0.426	1 (14,3)	0.581	0 (0)	1.0
Não	56	13 (23,2)		27 (48,2)		6 (10,7)		2 (3,6)	
Pólipos									
Presente	26	8 (30,8)	0.295	14 (53,8)	0.629	4 (15,4)	0.222	2 (7,7)	0.268
Ausente	50	10 (20)		24 (48)		3 (6)		1 (2)	
EC									
I/II	19	5 (26,3)	0.757	5 (26,3)	0.057	1 (5,3)	1.0	0 (0)	1.0
III/IV	49	11 (22,4)		27 (55,1)		5 (10,2)		2 (4,1)	
Metástase (diagnóstico)									
Presente	15	12 (22,4)	0.744	8 (53,3)	0.773	1 (6,7)	1.0	2 (13,3)	0.098
Ausente	61	13 (22,4)		30 (49,2)		6 (9,8)		1 (1,6)	
Características									
Características	N	MMR (%)	P	HR (%)	P	APC (%)	P	MUTYH (%)	P
Topologia									
Baixo/ Médio	50	14 (22,4)	0.749	27 (54)	0.621	2 (4)	0.099	2 (4)	1.0
Alto/ Retosigmóide	17	15 (22,4)		8 (47,1)		3 (17,6)		0 (0)	
Invasões									
Presente	26	16 (22,4)	0.619	15 (57,7)	0.326	3 (11,5)	0.698	1 (3,8)	1.0
Ausente	46	17 (22,4)		21 (45,7)		4 (8,7)		1 (2,2)	
Metástase linfonodal									
Presente	37	18 (22,4)	0.634	19 (51,4)	0.907	5 (13,5)	0.262	2 (5,4)	0.615
Ausente	38	19 (22,4)		19 (50)		2 (5,3)		1 (2,6)	

Legenda: EC: Estadiamento clínico, MMR: *Mismatch repair*, HR: *Homologous recombination*.

Em adição, foi realizada uma análise de associação com os dados clínicos e histopatológicos levando em consideração apenas variantes patogênicas e *likely*-patogênicas (Tabela 8).

Tabela 8 - Número de casos com variantes patogênicas e *likely*-patogênicas em *MUTYH* e em genes das vias MMR e HR e sua associação com características clínico-patológicas dos pacientes com CaRe.

Características	N	MMR (%)	P	HR (%)	P	<i>MUTYH</i> (%)	P
Idade							
≤40 anos	71	6 (8,5)	1.0	3 (4,2)	1.0	3 (4,2)	1.0
>40 anos	5	0 (0)		0 (0)		0 (0)	
Gênero							
Feminino	41	2 (4,9)	0.405	2 (4,9)	1.0	1 (2,4)	0.592
Masculino	35	4 (11,4)		1 (2,9)		2 (5,7)	
IMC							
<25	38	2 (5,3)	0.654	1 (2,6)	0.589	0 (0)	0.091
≥25	32	3 (9,4)		2 (6,3)		3 (9,4)	
Etilismo							
Sim	9	1 (11,1)	0.570	0 (0)	1.0	0 (0)	1.0
Não	51	4 (7,8)		3 (5,9)		2 (3,9)	
Tabagismo							
Sim	7	1 (14,3)	0.457	0 (0)	1.0	0 (0)	1.0
Não	56	4 (7,1)		3 (5,4)		2 (3,6)	
Pólipos							
Presente	26	5 (19,2)	0.016	1 (3,8)	1.0	0 (0)	0.547
Ausente	50	1 (2)		2 (4)		3 (6)	
EC							
I/II	19	1 (5,3)	1.0	0 (0)	0.554	1 (5,3)	1.0
III/IV	49	2 (6,1)		3 (6,1)		2 (4,1)	
Metástase (diagnóstico)							
Presente	15	1 (6,7)	1.0	1 (6,7)	0.488	0 (0)	1.0
Ausente	61	5 (8,2)		2 (3,3)		3 (4,9)	
Topologia							
Baixo/ Médio	50	5 (10)	1.0	3 (6)	0.565	2 (4,0)	1.0
Alto/ Retosigmóide	17	1 (5,9)		0 (0)		1 (5,9)	
Invasões							
Presente	26	0 (0)	0.152	2 (7,7)	0.294	1 (3,8)	1.0
Ausente	46	5 (10,9)		1 (2,2)		2 (4,3)	
Metástase linfonodal							
Presente	37	1 (2,7)	0.200	2 (5,4)	0.615	2 (5,4)	0.615
Ausente	38	5 (13,2)		1 (2,6)		1 (3,6)	

Legenda: EC: Estadiamento clínico, MMR: *Mismatch repair*, HR: *Homologous recombination*.

Na análise de sobrevida livre de doença, foi possível observar que indivíduos com variantes germinativas em genes associados à via HR apresentam menor sobrevida livre de doença (P log rank = 0,007; Figura 8). Não foi observado resultado significativo para variantes em genes da via MMR (P log rank = 0,921), *APC* (P log rank = 0,997) e *MUTYH* (P log rank = 0,536). Na análise de sobrevida livre de doença levando em consideração apenas variantes patogênicas e *likely*-patogênicas também não foi observado resultado significativo para genes das vias MMR (P log rank = 0,702), HR (P log rank = 0,915) e *MUTYH* (P log rank = 0,841).

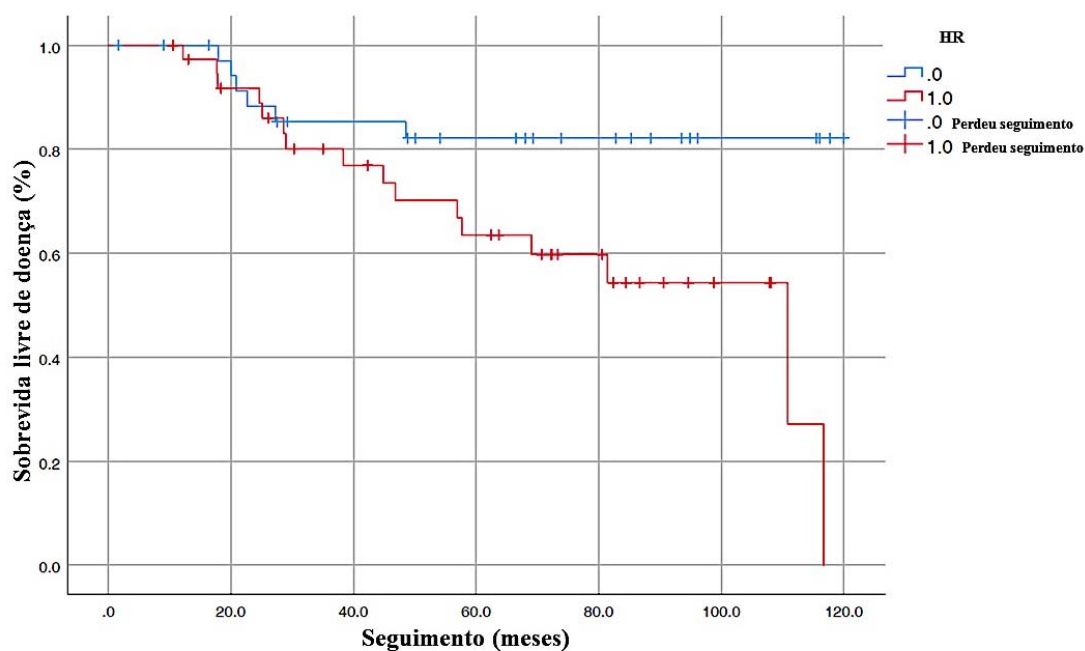


Figura 8 - Curvas de sobrevida livre de doença em relação às variantes germinativas (patogênicas, *likely*-patogênicas e VUS) em genes da via HR. Curva em azul representa indivíduos que não apresentaram variantes germinativas em genes da via HR e curva em vermelho representa indivíduos com variante germinativa em genes da via HR.

Nas análises de sobrevida livre de recidiva e de metástase não foram observados resultados significativos para genes da via MMR (P log rank = 0,667 e P log rank = 0,468, respectivamente), HR (P log rank = 0,131 e P log rank = 0,099, respectivamente), *APC* (P log rank = 0,750 e P log rank = 0,595, respectivamente) e *MUTYH* (P log rank = 0,726 e P log rank = 0,747, respectivamente). Ao investigar apenas variantes patogênicas e *likely*-patogênicas em genes das vias MMR (P log rank = 0,628 e P log rank = 0,718), HR (P log rank = 0,665 e P log rank = 0,605) e *MUTYH* (P log rank = 0,990 e P log rank = 0,852), também não foram observados resultados significativos na análise de sobrevida livre de recidiva e de metástase, respectivamente.

5.6 CONFIRMAÇÃO DAS ALTERAÇÕES CANDIDATAS EM PACIENTES SELECIONADOS COM CÂNCER DE RETO E SEUS FAMILIARES

As variantes selecionadas foram avaliadas em amostras de DNA dos probandos e seus familiares utilizando o sequenciamento de Sanger (Tabela 7). Todas as variantes foram confirmadas nos probandos; no entanto, apenas oito variantes foram identificadas em pelo menos um familiar.

O paciente B15 e seus familiares (duas irmãs) não foram investigados neste estudo, pois estes indivíduos realizaram o teste genético sob recomendação médica. O indivíduo B15 informou que ele e uma irmã com polipose aos 42 anos (B15-1) apresentaram duas variantes germinativas no gene *MUTYH* (c.1227_1228dupGG e c.536A>G), as mesmas identificadas neste estudo, e ambos os indivíduos cederam os

laudos para confirmação (Anexo 2 e 3). Não foi observada qualquer uma das variantes na irmã saudável (B15-2 laudo do teste genético não encontrado). A variante presente no gene *PMS2* (c.2264T>C) detectada no probando B46 foi confirmada por Sanger. A análise revelou se tratar do pseudogene *PMS2* e portanto, sem efeito funcional aparente.

Tabela 7 – Variantes encontradas por NGS e investigadas por sequenciamento de Sanger nos probandos e familiares.

Caso	Alterações NGS	ID	Parentesco	Fenótipo	Idade	Resultados	
A1	ATM: c.4303A>T (Patogênica)/ MSH2: c.1444A>T (Patogênica)	A1	Caso índice	CaRe	32	ATM	MSH2
		A1-1	Tia materna	CCR	53	AA	AT
		A1-2	Filha	Saudável	19	AT	AT
		A1-3	Filho	Saudável	16	AT	AA
A4	APC: c.2942_2943insTA (VUS)/ ATM: c.4414T>G (VUS)	A4	Caso índice	CaRe	28	APC	ATM
		A4-1	Irmão	Polipose colônica	24	Het - fs	TG
A8	ATM: c.8840C>A/c.640+3105 6G>T (VUS)/ MTHFR: c.1555C>T (VUS)	A8	Caso índice	CaRe	56	ATM	MTHFR
		A8-1	Irmão	Pólipos intestinais	60	CC	CT
		A8-2	Filha	Saudável	39	CA	CT
A15	APC: c.-43A>C (VUS)/ CCND1: c.779G>A (VUS)/ FGFR1: c.584A>G (VUS)/ MTHFR: c.4264A>G/c.*1320T>C (VUS)	A15	Caso índice	CaRe	51	APC	CCND1
		A15-1	Filha	CCR	31	AA	GG
		A15-2	Filha	Saudável	38	AA	GG
		A15-3	Primo	Ca rim	60	AA	GG
		A15-4	Filho do Primo	Adenocarcinóide no apêndice	31	AA	GG
B15	MUTYH: c.1227_1228dupGG (Frameshift)	B15	Caso índice	CaRe	34	Het - fs	
		B15-1	Irmã	Polipose	42	Het - fs	
B29	POLD1: c.353C>T (VUS)	B29	Caso índice	CaRe	23	CT	
		B29-1	Irmã	Polipose colônica	18	CT	
B31	APC: c.5236A>G (VUS)	B31	Caso índice	CaRe	29	AG	
		B31-1	Pai	Saudável	64	AA	
		B31-2	Irmão	Saudável	34	AA	
		B31-3	Tio paterno	CaRe	58	AA	
		B31-4	Tio paterno	Ca próstata/ leucemia mieloide crônica	68/71	AA	
B45	MUTYH: c.536A>G (Likely-Patogênica)/ MUTYH: c.902C>G (VUS)/ RAD51B: c.619G>T (VUS)					MUTYH c.902C>G	MUTYH c.536A>G
		B45	Caso índice	CaRe	32	CG	TC
		B45-1	Pai	Saudável	62	CC	TC
		B45-2	Irmão	Saudável	36	CG	TC
		B45-3	Irmã	Saudável	37	CG	TC
B46	CDKN2A: c.170C>A (VUS)/ PMS2: c.2264T>C (VUS)					PMS2	CDKN2A
		B46	Caso índice	CaRe	39	TC ^b	GT
		B46-1	Irmã	Ca tireoide	51	-	GT
		B46-2	Irmã	Saudável	55	-	GG

Legenda: VUS: Variante de significado incerto; CCR: Câncer Colorretal; Ca: Câncer; NI: Não Informado. Het - fs: alteração heterozigota do tipo *frameshift*. A idade dos indivíduos saudáveis representa a idade de coleta da amostra de saliva. Em **negrito** estão as variantes que foram investigadas por Sanger nos probandos e familiares. ^aA variante não foi confirmada por este estudo, mas por teste genético realizado pelo paciente. ^bA variante foi identificada no pseudogene de *PMS2* em B46.

O paciente A1, além de variante no gene *MSH2* (c.1444A>T) associado a Síndrome de Lynch, apresentou uma mutação patogênica em *ATM* (c.4303A>T). Ambas as alterações foram investigadas em três membros da família do caso índice A1: tia materna com CCR aos 53 anos (A1-1) e dois filhos saudáveis do paciente (A1-2: 19 anos e A1-3: 16 anos). A variante do gene *ATM* foi observada apenas nos indivíduos sem câncer até o momento da análise (A1-2 e A1-3) e a variante em *MSH2* foi identificada na tia materna com CCR (A1-1) e na filha saudável de 19 anos (A1-2). As duas variantes também foram confirmadas no caso índice por sequenciamento de Sanger (Apêndice 5A).

As variantes de significado incerto c.2942_2943insTA em *APC* e c.4414T>G em *ATM* foram identificadas no paciente A4. Este paciente foi diagnosticado com múltiplos pólipos e relata forte história de CCR familiar. Todos os familiares com câncer foram a óbito, no entanto um irmão vivo foi diagnosticado com polipose colônica aos 24 anos (A4-1). Neste indivíduo, foi possível detectar as mesmas variantes em *APC* e em *ATM* identificadas no probando (Apêndice 5B).

O paciente A8 apresentou duas variantes de significado incerto em *ATM* (c.8840C>A) e no gene *MTHFR* (c.1555C>T). O gene *ATM* foi o mais frequentemente alterado em pacientes com câncer de reto e o gene *MTHFR* desempenha um papel importante no processo de síntese e metilação do DNA, portanto ambas as alterações foram selecionadas para validação e análise de segregação. Embora o paciente A8 tenha ido a óbito, foi possível entrar em contato com sua filha (A8-2: saudável, 39 anos) que juntamente com o tio (A8-1: irmão do probando – pólipos colônicos aos 60 anos) aceitaram participar do estudo. Ambos os indivíduos apresentaram as duas alterações em *ATM* e *MTHFR*, as quais foram detectadas no probando por NGS e confirmadas por Sanger (Apêndice 5C).

O paciente A15 foi diagnosticado com cinco pólipos colônicos e reportou forte história familiar de câncer, especialmente CCR. Neste indivíduo, foram identificadas quatro variantes germinativas de significado incerto. Dentre essas, uma variante em *APC* (gene associado a FAP) e uma em *CCND1*, a qual foi detectada em 5 de 6 bancos de dados (dbNFSP) com potencial patogênico. Essas duas alterações foram selecionadas para validação em membros da família do paciente A15. Foi possível coletar amostras de saliva de três indivíduos com câncer (A15-1: filha com CCR aos 31 anos, A15-3: primo com câncer de rim aos 60 anos, e A15-4: primo de 2º grau com adenocarcinóide no apêndice aos 31 anos) e uma filha saudável (A15-2: 31 anos). Embora ambas as variantes tenham sido confirmadas por Sanger no probando, os familiares não apresentaram as variantes identificadas em *APC* e *CCND1* (Apêndice 5D).

Múltiplos pólipos colônicos foram observados no paciente B29. Embora este paciente não tenha sido classificado por Amsterdam, reportou CCR em sua mãe (diagnosticada com PAF) e pólipose colônica em sua irmã (PAF). A única variante identificada neste indivíduo foi detectada no gene *POLD1*: c.353C>T (associado a polipose associada a *polymerase proofreading*). Essa variante foi selecionada para avaliação em seus familiares. A mãe do paciente foi a óbito 5 anos após o diagnóstico de CCR e a irmã com polipose colônica aos 18 anos consentiu em participar do estudo. O sequenciamento por Sanger revelou que a irmã do probando (B29-1) também é portadora da variante c.353C>T em *POLD1* (Apêndice 5E).

A única alteração encontrada no paciente B31 foi uma variante de significado incerto no gene *APC* (c.5236A>G). Este paciente apresentou um pólipo colônico, tumor pMMR e dois tios paternos com câncer (reto e próstata). O gene *APC* é bem conhecido como associado ao risco de CCR e foi o único alterado neste paciente.

Quatro membros (B31-1: pai, saudável, 64 anos, B31-2: irmão, saudável, 34 anos, B31-3: tio paterno com CCR aos 58 anos, B31-4: tio paterno com câncer de próstata aos 68 anos e leucemia mielóide crônica aos 71 anos) da família B31 aceitaram participar do estudo e cederam amostras de saliva para teste genético. Entretanto, os familiares não apresentaram a variante identificada no probando (Apêndice 5F).

Duas variantes em *MUTYH* foram identificadas no indivíduo B45, sendo uma classificada como *likely*-patogênica (c.536A>G) (pelo ClinVar é categorizada como patogênica) e uma VUS (c.902C>G). O gene *MUTYH* está relacionado com a síndrome de polipose associada ao *MUTYH*, caracterizada por mutações bialélicas neste gene. Todos os familiares com câncer de B45 foram a óbito e quatro indivíduos saudáveis (B45-1: pai com 62 anos, B45-2: irmão com 36 anos, B45-3: irmã com 37 anos) aceitaram participar do estudo. Ambas as variantes foram avaliadas por Sanger no caso índice e nos quatro familiares. Todos os indivíduos da família B45 apresentaram a variante c.536A>G em *MUTYH* e apenas o pai (B45-1) não apresentou a variante c.902C>G em *MUTYH* (Apêndice 5G).

Duas variantes foram identificadas no indivíduo B46, uma no gene *PMS2* (c.2264T>C) em *PMS2* e outra em *CDKN2A* (c.170C>A). Ambas as variantes foram selecionadas para confirmação no probando e familiares. No entanto, a análise revelou que a variante está presente no pseudogene *PMS2* em B46, e portanto, os familiares não foram investigados para essa variante (Apêndice 5H). Em adição, o sequenciamento de Sanger confirmou a variante em *CDKN2A* no probando e detectou a mesma variante em uma irmã com história de câncer de tireoide aos 51 anos (B46-1).

6 DISCUSSÃO

O surgimento da tecnologia NGS permitiu o sequenciamento de alto rendimento de maneira efetiva e econômica, reduzindo os custos e o tempo de trabalho necessário para sequenciar diversos genes (MORGANTI et al. 2019). Essa metodologia surgiu como ferramenta capaz de identificar a base molecular de doenças sem etiologia definida e tem contribuído para a caracterização molecular, detecção, seguimento e tratamento de diversos tipos de neoplasias (LEVY e MYERS 2016; MORGANTI et al. 2019). Em busca de achados científicos robustos que permitam a identificação de alterações genéticas germinativas associadas ao CaRe, nós utilizamos a estratégia NSG para sequenciar genes alvo e investigar o seu envolvimento no risco de desenvolvimento desta neoplasia.

A análise simultânea de múltiplos genes em diferentes pacientes facilita o estudo de segregação em indivíduos da mesma família, comparação de genes mutados entre indivíduos de diferentes famílias e a identificação de variantes novas. No entanto, a análise da produção massiva de dados gerados pelo sequenciamento para a identificação de variantes patogênicas ainda é um grande desafio na pesquisa científica. O poder para detectar variantes é reduzido pela baixa qualidade do sequenciamento das bases e pela não uniformidade de cobertura (SIMS et al. 2014). Em nosso estudo, foi realizado o sequenciamento *paired-end* e todas as amostras apresentaram uma excelente cobertura para as regiões de interesse. O sequenciamento do tipo *paired-end* permite sequenciar as duas extremidades da mesma molécula de DNA separadas por uma distância conhecida, o qual associado a uma boa cobertura

diminuem os erros e contribuem para uma melhor identificação de variantes candidatas (MAJEWSKI et al. 2011).

É bem estabelecido que quanto maior a profundidade de sequenciamento menor a chance de resultados falso-negativos e falso-positivos, ou seja, quanto maior o número de leituras por base, maior a chance de identificar corretamente qualquer alteração de base (MAJEWSKI et al. 2011; GOH E CHOI 2012; SIMS et al. 2014). Em nosso estudo o sequenciamento alcançou uma média de 99% de bases com profundidade igual a 30x em todas as amostras (com exceção de A17 cuja média foi de 84,5%). Foi previamente reportado que uma profundidade média de 30 a 40x é suficiente para detectar com precisão as variantes germinativas em 95% do genoma (AJAY et al. 2011). No entanto, de acordo com MAJEWSKI et al. (2011) uma profundidade de 30x pode ser suficiente para o sequenciamento de regiões exônicas, mas uma profundidade de 100x é mais segura para garantir com precisão as variantes identificadas. Em nosso estudo foi observada uma média de 92% de bases com profundidade de cobertura igual a 100x em todas as amostras (exceto A17). Desta forma, os resultados obtidos do sequenciamento deste estudo permitiram a identificação segura de variantes potencialmente associadas ao desenvolvimento de CaRe. Em particular, o caso A17 apresentou uma excelente cobertura para os todos os genes descritos como associados com o câncer colorretal hereditário, no entanto nenhuma variante foi identificada nos genes avaliados para este paciente.

As diretrizes clínicas para a estratificação de risco do CCR dependem amplamente da história familiar de pacientes com este tipo tumoral. Entretanto, estima-se que apenas 5% dos casos de CCR familiar são explicados por alterações patogênicas em genes de alta penetrância (STOFFEL e KASTRINOS 2014). Além

disso, aproximadamente 1 em cada 10 novos casos diagnosticados com CCR afeta indivíduos jovens, mas abordagens clínicas atuais não conseguem detectar uma proporção significativa de indivíduos jovens com mutações germinativas associadas ao CCR (ABDELSATTAR et al. 2016; STOFFEL et al. 2018). A identificação de pacientes com câncer familiar é um objetivo de alta relevância, pois um diagnóstico precoce e um rastreamento adequado podem prever e ou melhorar o prognóstico da doença.

Em nosso estudo identificamos variantes patogênicas ou *likely*-patogênicas em 18% (14/76) dos pacientes sendo que a maioria das alterações ocorreram em genes de alta penetrância. Semelhante aos nossos resultados, GONG et al. (2019) em uma coorte de 618 pacientes com CCR relataram 18% (112/618) destes com variantes germinativas patogênicas ou *likely*-patogênicas e com a maioria das alterações envolvendo genes de alta penetrância.

Variantes germinativas em genes de alta penetrância associados a síndromes hereditárias conhecidas foram comumente encontradas. A prevalência de indivíduos com variantes associadas à Síndrome de Lynch (8%, 6/76) e à polipose associada ao *MUTYH* (MAP: 3%, 2/76) é consistente com os dados da literatura (CASTILLEJO et al. 2014; PEARLMAN et al. 2017). Entre os pacientes com variantes (patogênicas e *likely*-patogênicas) em genes MMR associados à Síndrome de Lynch, três (21%) foram classificados por Amsterdam I/II (Grupo 1) e dois (14%) casos eram do Grupo 2 (≤ 40 anos). Vale ressaltar que apenas o caso A22 teve o tumor investigado para as proteínas MMR (MSH2-, MSH6-, MLH1+, PMS2+), concordante com os achados da presença da variante patogênica em *MSH2* (c.2152C>T). Os pacientes do Grupo 2 que apresentaram variantes patogênicas em *MSH6* (B13: c.3013C>T) e *MLH1* (B30:

c.1011delC) tinham seus tumores com a deficiência para essas proteínas. Embora estes dois casos (B13 e B30) não tenham sido classificados pelo critério de Amsterdam por não apresentarem história familiar de câncer, os resultados de IHQ foram concordantes com os achados do tNGS. É possível que ambos os pacientes não souberam relatar ou não tiveram conhecimento do histórico de câncer presente na família ou que sejam portadores de mutações novas. A pesquisa realizada pelo uso de painel multigênico em pacientes com CaRe facilitou a identificação de pacientes com síndrome de câncer hereditário que seriam negligenciados se fossem utilizados apenas os critérios clínicos estridentes como Amsterdam I ou II.

A prevenção de CCR em pacientes com SL é realizada por meio de colonoscopia regular e remoção de adenomas (ARGILLANDER et al. 2019). Comparado a pacientes com polipose atenuada (FAP e MAP), pacientes com SL desenvolvem poucos adenomas colorretais (geralmente < 3 adenomas) (BROSENS et al. 2015). Além disso, a sequência adenoma-carcinoma parece ser mais rápida na SL quando comparada ao CCR esporádico, uma vez que pequenos adenomas podem se desenvolver em câncer dentro de um período de um a dois anos enquanto a transformação maligna nos cânceres esporádicos ocorre em 10 anos (ARGILLANDER et al. 2018). Nos indivíduos com SL identificados no presente estudo, três pacientes classificados pelos critérios de Amsterdam apresentaram pólipos colônicos, incluindo o caso A9 (um pólipó sésil no ceco e um pólipó na transição retosigmóide), A19 (um pólipó sésil no cólon transversal) e A22 (um pólipó no cólon transversal e um no íleo terminal). Adenomas em pacientes com mutação em genes MMR apresentam taxas de deficiência de MMR por IHC de 50 a 80% (ZHU et al. 2019). Em nosso estudo, dos seis pacientes (A1, A9, A19, A22, B13 e B30) com variantes patogênicas ou *likely-*

patogênicas em genes MMR, apenas A22, B13 e B30 apresentaram dMMR (os demais não tiveram os tumores avaliados para IHQ), e destes, apenas o indivíduo A22 foi diagnosticado com pólipos. Considerando que 46% dos pacientes incluídos neste estudo não tiveram seus tumores avaliados para as proteínas MMR por IHQ, não foi possível estabelecer uma correlação entre estes dados e variantes encontradas nos genes MMR.

Uma variante patogênica em *MSH2* (c.1444A>T) foi confirmada por sequenciamento de Sanger em A1 e identificada em dois familiares (tia materna com CCR aos 53 anos e filha saudável do probando). O probando A1 foi classificado pelo critério de Amsterdam I e confirmado molecularmente como tendo Síndrome de Lynch pela presença da variante patogênica em *MSH2*. É importante que essa família receba aconselhamento genético e seja acompanhada periodicamente com exames preventivos, especialmente sua filha (A1-2) que embora não tenha desenvolvido CCR, possui a variante patogênica c.1444A>T em *MSH2*. Em adição, uma variante patogênica em *ATM* (c.4303A>T) identificada em A1, foi confirmada no probando e identificada em dois familiares saudáveis (A1-2: filha com 19 anos e A1-3: filho com 16 anos). Essa variante foi reportada em literatura uma única vez, em um indivíduo brasileiro com a Síndrome de *Ataxia Telangiectasia* (MITUI et al. 2003). A doença é caracterizada pela presença de ataxia cerebelar progressiva, telangiectasia óculo-cutânea, apraxia ocular, infecções sinopulmonares de repetição, imunodeficiência, risco aumentado para o desenvolvimento de neoplasias e hipersensibilidade à radiação ionizante e a agentes radiomiméticos (LAVIN 2008; RAHNER e STEINKE 2008). O paciente A1 não apresenta esse fenótipo característico exceto a presença do câncer o que sugere que essa variante tem penetrância incompleta na família A1.

As variantes patogênicas aqui identificadas no gene *MSH2* (c.1444A>T, c.2152C>T e c.1968C>G) foram previamente reportadas em pacientes com Síndrome de Lynch (MANGOLD et al. 2005; KURZAWSKI 2006; DE LELLIS et al. 2013; CARNEIRO DA SILVA et al. 2015; ADACHI et al. 2017; ROSSI et al. 2017; VARGAS-PARRA et al. 2017). Em adição, a variante *likely*-patogênica *MSH2* c.518T>G identificada em nosso estudo, também já foi previamente reportada em pacientes com suspeita para Síndrome de Lynch (ROSSI et al. 2017; VARGAS-PARRA et al. 2017). Esta variante (c.518T>G) foi identificada por VARGAS-PARRA et al. (2017) em três famílias e por meio de teste multifatorial reclassificaram essa variante como patogênica.

O paciente A3 classificado pelos critérios de Amsterdam apresentou instabilidade de microssatélite e perda de expressão das proteínas *MLH1* e *PMS2* no tumor. Neste paciente não foram identificadas variantes germinativas nos genes MMR por tNGS, sugerindo pertencer a Síndrome de Lynch-like (SLL). Segundo PICÓ et al. (2019), é possível que indivíduos com SLL com forte história familiar de câncer apresentem alterações germinativas (regiões regulatórias, inversões ou translocações) nos genes MMR ou alterações críticas (não detectáveis pelos métodos atuais) que podem provocar alteração somática do outro alelo MMR. Como não foram realizadas outras metodologias como o sequenciamento de todo o genoma, o qual permite investigar todos os genes do genoma, rearranjos ou alterações no número de cópias, não foi possível esclarecer o seu diagnóstico em nível molecular.

Vale ressaltar, que o paciente A14 apresentou uma VUS que resultou em ganho do códon de parada (*stop gained*) em *MSH2*: c.2785C>T e uma VUS *likely*-patogênica em *NOTCH1* (c.2704C>T). Alterações genéticas em genes da via de sinalização

NOTCH foram reportadas em diversas neoplasias, incluindo tumores sólidos e hematopoiéticos (NTZIACHRISTOS et al. 2014). Em CCR, alterações somáticas em NOTCH foram associadas com a progressão tumoral e prognóstico desfavorável (VINSON et al. 2015). Diversas variantes foram descritas em membros da família NOTCH em doenças congênitas e múltiplos tumores (WEN et al. 2014; MAŠEK e ANDERSSON 2017), no entanto o seu papel no risco de CCR ainda não é definido. O paciente A14 reportou forte história familiar de CCR (Amsterdam I) e embora tenha sido diagnosticado em estadiamento clínico avançado, não apresentou invasão tumoral ou metástase. Desta forma, aparentemente a variante germinativa identificada no gene *NOTCH1* parece não estar associada com agressividade tumoral neste paciente. Apesar de não sabermos ao certo o papel de variantes germinativas em *NOTCH1* no risco de CCR, genes da via MMR são bem estabelecidos no aumento do risco destas neoplasia. Portanto é importante verificar o papel da VUS *MSH2: c.2785C>T* identificada no probando A14, a qual pode ser estar associada ao risco de desenvolvimento da doença.

As variantes *likely*-patogênicas no gene *MUTYH: c.536A>G* e *c.1187G>A* são responsáveis por aproximadamente 80% dos casos de polipose associada ao *MUTYH* em populações caucasianas (MARRA e JIRICNY 2003; JASS 2008). A variante *c.536A>G* foi identificada nos pacientes B15 e B45, os quais também apresentaram variantes de significado incerto (*c.1227_1228dupGG* e *c.902C>G*, respectivamente) em *MUTYH*. O paciente B8 apresentou a variante *likely*-patogênica *c.1187G>A*. A polipose associada ao *MUTYH* é caracterizada por alterações bialélicas germinativas no gene *MUTYH* (NIELSEN et al. 2011). Em geral, pacientes com esta síndrome apresentam pólipos adenomatosos ou sésseis serrilhados, no entanto foram observados

indivíduos que desenvolveram câncer com alterações patogênicas neste gene e sem presença de pólipos (NIELSEN et al. 2011; GUARINOS et al. 2013). Pólipos sésseis foram relatados nos indivíduos B15 e B45, no entanto essa informação não foi observada para o paciente B8. A presença de duas variantes diferentes no gene *MUTYH* nos pacientes B15 (c.1227_1228dupGG e c.536A>G) e B45 (c.536A>G e c.902C>G) sugere que ambos sejam portadores da polipose associada ao *MUTYH*. GUARINOS et al. (2013) identificaram dois indivíduos com polipose associada ao *MUTYH* com as mesmas alterações encontradas no paciente B15 do nosso estudo. Os testes genéticos realizados sob orientação médica para a família de B15 confirmou ambas as variantes (c.1227_1228dupGG e c.536A>G) no caso índice e em uma irmã com polipose (B15-1) (Anexos 2 e 3, respectivamente). Embora a variante c.902C>G em *MUTYH* detectada no paciente B45 não tenha sido reportada em literatura, os seis algoritmos utilizados para análise *in silico* pelo banco de dados para predição funcional das variantes prejudiciais ou desconhecidas (dbNFSP) apontaram para patogenicidade desta variante. Não foi possível investigar os familiares afetados pela doença nessa família (todos foram a óbito), no entanto, três familiares (pai, irmão e irmã) saudáveis que aceitaram participar da pesquisa foram identificados com a variante *likely*-patogênica c.536A>G em *MUTYH*, e dois deles (irmão e irmã) também apresentaram a VUS c.902C>G. Embora, os familiares investigados não tenham desenvolvido câncer até o momento, os dados apresentados sugerem que B45 é portador de polipose associada ao *MUTYH*, e portanto, os familiares devem ser investigados para a presença de pólipos e encaminhados para aconselhamento genético.

Os indivíduos A4 e A15, com história forte história familiar de câncer (Amsterdam I) apresentaram VUS em *APC*. Variantes sem sentido, *frameshift*,

pequenas deleções, e rearranjos genômicos causados por alterações em sítios de *splice* e deleções de *introns* que levam a proteínas truncadas e perda de função de *APC*, são frequentemente associadas ao desenvolvimento de Polipose Adenomatosa Familiar (PAF) (PLAWSKI e SLOMSKI 2008; ARETZ et al. 2013). O indivíduo A4 apresentou uma variante *frameshift* c.2942_2943insTA e A15 uma variante na região 5'UTR c.-43A>C em *APC*, e as duas alterações não foram descritas em bancos de dados públicos (gnomAD Genomes, gnomAD Exomes e ABRaOM) ou reportadas em literatura. Os nossos achados na análise de segregação revelou que A4-1 (irmão do paciente A4 e que é portador de polipose) apresentou a mesma variante em *APC*, sugerindo que esta variante deveria ser reclassificada pelo ACMG (classe 4 ou 5).

É bem estabelecido que mutações germinativas em *APC* aumentam o risco de CCR e podem estar associadas à PAF (LEOZ et al. 2015). Ambos os indivíduos (A4 e A15) apresentaram múltiplos pólipos. Na análise de segregação, foi possível observar que um irmão (A4-1) de A4, diagnosticado com polipose colônica, também apresentou a variante c.2942_2943insTA em *APC*. Em adição, a variante *ATM*: c.4414T>G encontrada em A4, foi confirmada no probando e identificada em A4-1. Concordante este achado, um estudo prévio identificou *ATM*:c.4414T>G em pacientes com história de câncer relacionado a SL (YURGELUN et al. 2015). Embora essas variantes tenham sido classificadas com significado incerto, os dados clínicos e de segregação reforçam o papel de *APC* no risco de CaRe associado a PAF e aponta *ATM* como gene de predisposição ao CaRe. Ambas as variantes devem ser consideradas no risco desta neoplasia e melhor investigadas para reclassificação quanto a patogenicidade. O indivíduo A4-1 não desenvolveu tumor, no entanto, pelo fato de ter apresentado polipose colônica e a variante *ATM*:c.4414T>G familiar, deve ser acompanhamento

médico para detecção precoce de um eventual tumor e passar por aconselhamento genético para discutir o risco pessoal e familiar para o CCR.

A variante *APC* c.-43A>C foi investigada por sequenciamento de Sanger em quatro familiares do paciente A15 (A15-1: filha com CCR aos 31 anos, A15-2: filha saudável com 38 anos, A15-3: primo com câncer de rim aos 60 anos e A15-4: filho do primo com adenocarcinóide no apêndice aos 31 anos) não sendo confirmada. Sua presença estava restrita ao paciente. De forma semelhante, a variante *CCND1* c.779G>A também identificada em A15 também não foi encontrada nos familiares. Os dados indicam que a história de tumores nesta família deve estar associada a alguma alteração genética ainda não identificada.

Em adição, outra variante *frameshift* em *APC* (B36: c.3183_3187delACAAA) foi identificada neste estudo. Essa variante foi previamente relatada como tendo um efeito fundador em pacientes espanhóis (das Ilhas Baleares) com CCR, presente em pacientes com PAF (GONZÁLEZ et al. 2005; FOSTIRA et al. 2010; JARRY et al. 2011; RIVERA et al. 2011). O paciente B36 apresentou múltiplos pólipos colônicos e não reportou história de câncer na família. Curiosamente, além de *APC* (c.3183_3187delACAAA), apenas uma VUS *missense* em *ATM* (c.3240C>A) foi identificada em B36. Os achados sugerem que apesar de não serem classificadas como patogênicas ou *likely*-patogênicas, essas variantes podem contribuir para o aumento do risco de desenvolvimento de CCR.

Uma VUS *missense* c.5236A>G em *APC* foi identificada no indivíduo B31. Este indivíduo foi diagnosticado com um pólipó no cólon transversal, tumor pMMR, EC avançado e apresentou metástase pulmonar e no baço. Em sua história familiar, B31 reportou ter um tio paterno com CaRe e um tio paterno com câncer de próstata e

leucemia mielóide. Essa variante não foi reportada em pacientes com CCR, no entanto, devido pelo fato de ter sido a única variante identificada neste indivíduo, do gene *APC* ser bem estabelecido no risco de desenvolver CCR e a história pessoal e familiar de câncer, nós investigamos a família de B31. Apesar dessa variante ter sido confirmada por Sanger em B31, nenhum dos indivíduos avaliados (pai e irmão saudáveis, tio paterno com CCR e outro tio com múltiplos tumores) apresentaram essa variante. Uma explicação é que essa variante não teria potencial patogênico e, portanto, outra alteração não identificada seria responsável pela doença no paciente e seus familiares ou, alternativamente, que essa seria uma mutação nova no paciente e poderia contribuir para o risco de desenvolvimento da doença, independente da história dos seus tios.

O gene *POLD1* têm sido associado a um maior risco de desenvolver múltiplos adenomas colorretais e CCR (BELLIDO et al. 2016; ROSNER et al. 2018). Este gene tem uma função de revisão, realizada pelo seu domínio de exonuclease, que detecta e remove as bases erradas na fita de DNA (VALLE et al. 2019). Variantes patogênicas germinativas no domínio de exonuclease *POLD1* têm sido reportadas na predisposição à polipose associada a polimerase *proofreading*, seguindo padrão de herança autossômica dominante (VALLE et al. 2019). Nós identificamos três VUS em *POLD1* (c.3010G>A, c.353C>T e c.530G>A), embora nenhuma destas variante tenham sido identificadas no domínio de exonuclease. A variante *POLD1* c.353C>T foi identificada em um paciente jovem (B29) com múltiplos pólipos, tumor pMMR, e história familiar de pólipos colônicos (mãe: CCR e PAF, irmã: PAF). Os familiares foram clinicamente diagnosticados com PAF (reportado pelo paciente), no entanto a única variante, dos genes avaliados pelo painel, identificada em B29 foi *POLD1* c.353C>T. Foi possível identificar em sua irmã com polipose a mesma alteração em

POLD1 (c.353C>T), sugerindo que essa variante pode ser responsável pelo risco de CCR na família estudada (B29) e pode estar associada à polipose associada a *polymerase proofreading*. Para o nosso conhecimento, este é o primeiro relato da variante c.353C>T em *POLD1* em pacientes com polipose/ câncer de reto. Nossos dados sugerem que esta variante tem potencial patogênico no risco o desenvolvimento do CCR.

É importante ressaltar que, até o momento, na prática clínica tem sido oferecido testes genéticos para avaliação de alterações germinativas seletivamente para pacientes que preenchem critérios clínicos para síndromes de câncer hereditário conhecidas. Para isso, tem sido realizado o sequenciamento do DNA limitado a genes de alta penetrância associados a fenótipos específicos. Pacientes com CCR e forte história familiar destes tumores cujos testes genéticos não revelam quaisquer mutações em genes conhecidos, provavelmente devem abrigar mutações ainda não bem estabelecidas (FORD 2018). Em adição, testes genéticos germinativos usando painéis multigênicos em pacientes com câncer de mama, ovário e CCR têm revelado a presença de diversas variantes germinativas que não seriam previstas com base na história clínica desses pacientes (WALSH et al. 2011; KURIAN et al. 2014; CRAGUN et al. 2014; YURGELUN et al. 2015; YURGELUN et al. 2017; DERYCKE et al. 2017; PEARLMAN et al. 2017; STOFFEL et al. 2018; MARTIN-MORALES et al. 2018; GONG et al. 2019).

Nos últimos anos, estudos investigando indivíduos com CCR e história familiar sugestiva para doença autossômica dominante têm identificado uma fração de indivíduos com variantes germinativas patogênicas em *BRCA2*, sugerindo que este gene pode contribuir para o risco aumentado de CCR (ESTEBAN-JURADO et al.

2015; GARRE et al. 2015; YURGELUN et al. 2015). Um estudo prévio reportou variantes em *BRCA2* em famílias com câncer colorretal familiar do tipo X (CCFTX) (GARRE et al. 2015). Ao investigarem *BRCA2* em 48 probandos de famílias com um padrão de herança dominante para CCR, sem alterações em nenhum dos genes de predisposição hereditária ao CCR conhecidos, os autores encontraram uma variante *frameshift* (c.3847_3848delGT) co-segregando com a doença nos familiares e mostraram perda de heterozigose nos tumores (GARRE et al. 2015). No entanto, o risco de CCR em pacientes com variantes patogênicas em *BRCA2* ainda têm sido bastante discutido (OH et al. 2018; KATONA et al. 2019; YANG et al. 2019). Em nosso estudo, uma mutação patogênica em *BRCA2* (c.7819delA) foi identificada no indivíduo A6 (Amsterdam I) que reportou história de CCR (tio paterno, avô paterno, tia paterna e tia materna) e próstata (pai) na família. Este indivíduo apresentou apenas essa variante germinativa identificada por tNGS e teve tumor pMMR, sendo, portanto, classificado como CCFTX. A variante encontrada (c.7819delA) foi reportada pela primeira vez por OW et al. (2019) ao investigar 1056 indivíduos asiáticos com suspeita para câncer de mama hereditário dos quais 460 foram avaliados para alterações germinativas em diferentes genes. Os autores relataram essa mutação em um indivíduo saudável (sem câncer) com história de câncer de mama na família (três tias paternas com câncer de mama antes dos 40 anos) (OW et al. 2019). Para o nosso conhecimento este é o primeiro trabalho a reportar essa variante em *BRCA2* (c.7819delA) em paciente com CCFTX, e portanto foi selecionada para confirmação no probando e seus familiares. Infelizmente o paciente A6 foi a óbito em 2011 e não foi possível contactar seus familiares. Apesar de não ter sido possível realizar uma análise de segregação, os nossos dados sugerem que mutação em *BRCA2* pode contribuir para risco de CaRe

familiar e que esta família deveria ser testada para a presença da mutação e acompanhada clinicamente.

Nós também identificamos uma nova variante (não relatada em banco de dados públicos ou reportadas em literatura) em *BRCA2* (c.7937G>A) no paciente A2. Este paciente reportou história de câncer de mama em duas tias e uma prima materna, além de CCR no avô materno (essa família se enquadra nos critérios clínicos para o câncer de mama e ovário hereditário). Vale ressaltar, que este paciente não apresentou pólipos, foi diagnosticado em estadiamento avançado (IV), com invasão perineural e metástase hepática. Este probando também foi identificado com uma VUS em *MLH3* (c.4360T>C, *stop lost*). O *MLH3* foi previamente reportado como gene de predisposição de baixa penetrância ao CCR (LIU et al. 2003; KORHONEN et al. 2008). Diversas variantes germinativas heterozigotas em *MLH3* estão listadas no banco de dados InSiGHT. Embora não se saiba o significado clínico destas variantes, elas podem estar relacionadas ao câncer familiar, inclusive associadas a SL (WU et al. 2001; LIU et al. 2003). Um estudo recente (OLKINUORA et al. 2019) reportou uma variante germinativa em *MLH3* (c.3563C>G) em pacientes com polipose adenomatosa e microssatélite estável. O paciente A2 não apresentou nenhum pólipos intestinal ao diagnóstico, no entanto foi observado tumor pMMR. Embora esta família tenha sido selecionada para confirmação dos achados, A2 foi a óbito e não foi possível contactar os familiares. A variante *BRCA2* (c.7937G>A) e a *MLH3* (c.3563C>G) podem também contribuir para o risco de desenvolvimento da doença e esclarecer a relação genótipo-fenótipo de pacientes com CCCTX. O fato do paciente pertencer a síndrome hereditária do cancer de mama e ovário familiar e a presença da variante e a extrapolação dos dados da literatura nos permite supor que variantes germinativas em

MLH3 podem levar a falhas na resposta a danos no DNA ou aos processos relacionados à recombinação (BOUUAERT e KEENEY 2017) resultando num risco aumentado de desenvolvimento da doença.

Curiosamente, A8 reportou forte história familiar de CCR (irmão: CCR aos 52 anos, irmã: CaRe aos 57 anos, irmão: câncer de esôfago aos 60 anos, irmão: pólipos intestinais aos 60 anos e pai: câncer gástrico aos 72 anos) e apenas duas variantes foram identificadas neste indivíduo (*ATM*: c.8840C>A/c.640+31056G>T e *MTHFR*: c.1555C>T). A variante c.8840C>A/c.640+31056G>T em *ATM* foi confirmada por sequenciamento de Sanger no probando A8 e em uma filha saudável (A8-2), mas não foi observada em irmão com pólipos intestinais (A8-1). Até o momento, um único polimorfismo (c. 677C>T) em *MTHFR* foi reportado como associado ao risco do CCR, bem como em câncer de mama e ovário; no entanto, o papel dessa alteração para o risco de desenvolver câncer é controverso (HE e SHEN 2017). A variante *MTHFR*: c.1555C>T foi identificada em outros dois pacientes (A7 e B32) deste estudo além de A8. O produto codificado pelo gene *MTHFR* atua na via metabólica do DNA, especialmente no processo de síntese e metilação do DNA (HE e SHEN 2017). Alterações na função de *MTHFR* pode consequentemente levar a um acúmulo de homocisteína e diminuição de folato (associado à proliferação celular) e desequilíbrio de metilação do DNA (hipometilação) contribuindo assim para a oncogênese (HASAN et al. 2019). Portanto, é possível que a variante *MTHFR*: c.1555C>T tenha um efeito potencial no risco de desenvolvimento da doença. Essa variante (c.1555C>T) foi confirmada no probando (A8) e identificada em indivíduos sem câncer (A8-2: filha saudável) e com pólipos colônicos (A8-1: irmão com pólipos colônicos), sugerindo que este gene pode desempenhar um papel importante no risco do câncer de reto. Para

o nosso conhecimento este é o primeiro trabalho a identificar variante germinativa em *MTHFR* em pacientes com CaRe, com potencial patogênico. Estudos funcionais são importantes para elucidar o papel destas variantes no risco de desenvolver esta neoplasia.

Outro achado importante foi a frequência de variantes encontradas em pacientes jovens. Há alguns anos, os estudos investigando pacientes jovens com CCR sem história familiar de câncer reportavam mutações germinativas em apenas 5-10% dos casos, sugerindo que a causa da grande maioria dos casos não era genética (LIMBURG et al. 2011; CHANG et al. 2012). Nos últimos anos, com o advento da tecnologia de NGS e sua aplicação na área, foi observado um aumento na taxa de variantes patogênicas e *likely*-patogênicas nestes indivíduos (YURGELUN et al. 2015; YURGELUN et al. 2017; PEARLMAN et al. 2017; STOFFEL et al. 2018; GONG et al. 2019).

Estudos recentes relatam uma taxa de variantes patogênicas ou *likely*-patogênicas ao redor de 16% e 21% em indivíduos jovens (< 50 anos), respectivamente (PEARLMAN et al. 2017; STOFFEL et al. 2018 e GONG et al. 2019). Embora nosso estudo tenha considerado jovens indivíduos com idade igual ou inferior a 40 anos, foi possível observar uma taxa de variantes patogênicas ou *likely*-patogênicas (17%) bastante semelhante neste grupo de pacientes. Pequenas diferenças podem ser devido aos diferentes painéis multigênicos utilizados ou a população investigada.

Em nosso estudo, um a cada seis pacientes jovens com CaRe (não classificados por Amsterdam, Grupo 2) apresentou pelo menos uma variante patogênica ou *likely*-patogênica (17%, 8/47). Dentre estes, dois (14%, 2/14) não reportaram câncer na família e seis (43%, 6/14) tiveram pelo menos um caso de câncer na família mas não

preencheram os critérios clínicos para síndrome de câncer hereditária. Taxas similares de variantes patogênicas ou *likely*-patogênicas em pacientes jovens sem história familiar foram reportadas por PEARLMAN et al. (2017) (14%, 10/72) e STOFFEL et al. (2018) (16%, 13/79). Em conjunto, os dados apontam para a necessidade de expandir o teste genético clínico em pacientes jovens com CCR além da prática atual de oferecer sequenciamento somente àqueles que apresentam fenótipos clássicos associados a síndromes de CCR hereditário.

Além de alterações patogênicas em genes de alta penetrância buscamos identificar alterações pouco caracterizadas, incluindo um conjunto específico de genes de baixa ou moderada penetrância. Enquanto a maioria das variantes identificadas ocorreram em genes associados ao CCR, 3 dos 8 (37%) pacientes jovens tiveram variantes patogênicas ou *likely*-patogênicas em genes não tradicionalmente associados ao CCR: *ATM* (um probando) e *MTHFR* (dois probandos). Estudos similares também encontraram variantes germinativas em genes ainda não bem estabelecidos no risco ao CCR (YURGELUN et al. 2017; DERYCKE et al. 2017; PEARLMAN et al. 2017; STOFFEL et al. 2018; MARTIN-MORALES et al. 2018; GONG et al. 2019).

Em 2017, o *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) recomendou que todos os indivíduos com CCR diagnosticados com menos de 50 anos considerem o aconselhamento e teste genético dado à chance de 16% terem mutação em genes de predisposição ao câncer. Os autores estimam que metade dos casos esteja associado à SL, um sexto apresente mutação em outros genes de alta penetrância associados ao CCR (*APC* e *SMAD4*), um sexto tenha mutação em genes de risco moderado para o CCR (*APC* I1307K ou *MUTYH* em heterozigose) e um sexto tenha mutação em genes

ainda não associados ao CCR familiar (*BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*, dentre outros) (PEARLMAN et al. 2017).

Em nosso estudo, entre os 71 indivíduos diagnosticados com CaRe com idade igual ou inferior a 40 anos, 20% (14/71) apresentaram variantes em genes associados à predisposição hereditária ao câncer (*MSH2*, *MSH6*, *MLH1*, *MUTYH*, *ATM* e *BRCA2*). Entre os 14 indivíduos com variantes patogênicas ou *likely*-patogênicas, seis (43%) apresentaram tais variantes em genes MMR associadas a Síndrome de Lynch, dois (14%) com mutação provavelmente bialélica em *MUTYH*, um (7%) com variante monoalélica em *MUTYH* e três (21%) com variantes em genes não associados ao CCR familiar (*ATM* e *BRCA2*). Os nossos achados foram consistentes com os dados de PEARLMAN et al. (2017), com pequenas diferenças para os grupos de genes, que pode ser devido ao número amostral das diferentes casuísticas. Os dados reforçam a importância do rastreamento para CaRe em indivíduos jovens e a necessidade de ampliação de painel de genes utilizados atualmente na prática clínica para avaliação do risco de CCR familiar.

Entre as variantes identificadas em nosso estudo, *ATM* foi frequentemente alterado (19%) em pacientes com CaRe. Estima-se que aproximadamente 2% da população geral apresente uma variante heterozigota em *ATM* e que indivíduos portadores destas variantes tem um risco maior para desenvolver câncer de mama e, potencialmente, câncer de pâncreas (CREMONA e BEHRENS 2014; JERZAK et al. 2018). O papel de *ATM* em pacientes com CCR ainda não é bem estabelecido (NATIONAL COMPREHENSIVE CANCER NETWORK 2017). No entanto, ALDUBAYAN et al. (2018) sugeriram que *ATM* é um gene de predisposição ao CCR de penetrância moderada. Os autores reportaram uma frequência maior de variantes

patogênicas em *ATM* em pacientes com CCR, em relação a pacientes sem câncer, e a perda completa de *ATM* nos tumores destes pacientes, como resultado de eventos somáticos deletérios adquiridos, sugerindo um papel crítico de *ATM* na tumorigênese colorretal (ALDUBAYAN et al. 2018).

O paciente B14 da nossa casuística apresentou uma variante *likely*-patogênica em *ATM* c.8122G>A/c.641-26009C>T. Essa variante (c.8122G>A) foi reportada uma única vez em um indivíduo com a síndrome de ataxia telangiectasia com história de câncer de mama, rhabdomyosarcoma e meduloblastoma na família (CLAES et al. 2013). O indivíduo B14 não é portador dessa síndrome e não foi possível investigar a variante *ATM* c.8122G>A nesta família. No entanto, c.8122G>A tem sido reportada como alteração somática em câncer de pulmão, trato urinário, faringe e tireoide pelo COSMIC. É possível que essa variante na linhagem germinativa contribua para o aumento do risco de CaRe.

Em adição, três indivíduos jovens (B17, B21 e B40) não aparentados apresentaram uma VUS em *ATM* (c.8734A>G). Essa variante (*ATM*: c.8734A>G) foi previamente descrita como associada a predisposição hereditária ao câncer de mama e com risco sete vezes maior para desenvolver esta neoplasia (THORSTENSON et al. 2003; PYLKÄS et al. 2007; TAVTIGIAN et al. 2009; HOLLESTELLE et al. 2010; TUNG et al. 2016). PYLKÄS et al. (2007) reportaram que a variante c.8734A>G em *ATM* é mais frequente em indivíduos com câncer de mama familiar comparado àqueles com câncer de mama esporádico e saudáveis, e demonstrou ter penetrância incompleta. No presente estudo, apenas o paciente B21 reportou câncer na família (uma tia paterna com câncer de reto aos 56 anos), no entanto o paciente foi a óbito em 2018 e não foi possível contactar familiares para análise de segregação. Vale ressaltar, que B17, B21

e B40 apresentaram características clínicas bastante semelhantes (tumor pMMR, estadiamento avançado e metástases no seguimento clínico). Embora poucos estudos tenham reportado *ATM*: c.8734A>G associada ao câncer, especialmente CCR, o nossos achados sugerem o envolvimento dessa variante não apenas na tumorigênese como na progressão da doença em indivíduos jovens e reforçam a necessidade de investigar melhor o papel dessa variante utilizando estudos funcionais para investigar sua patogenicidade.

Dois pacientes jovens (B5 e B7) apresentaram uma variante *stop gained likely-patogênica* em *MTHFR* (c.233C>G). Variantes sem sentido (*stop gained*) e que alteram o quadro de leitura (nas quais uma ou mais bases são inseridas ou deletadas, conhecidas como *frameshift*) interrompem mais brutalmente a estrutura da proteína do que variantes *missense* e deleções *inframe* (deleções que envolvem pelo menos 3 bases e removem o códon inteiro impedindo a formação de determinado aminoácido da proteína), portanto elas são mais propensas a ter consequências patogênicas (ZHOU et al. 2018). Não foi possível verificar a presença de *MTHFR*: c.233C>G, pois na família de B5 todos os familiares com câncer foram a óbito e B7 também foi a óbito (não foi possível contactar familiares). Devido ao importante papel de *MTHFR* na via metabólica do DNA e o potencial patogênico de variantes *stop gained*, nossos dados sugerem que a variante *MTHFR*: c.233C>G identificada em dois indivíduos não aparentados contribui para o risco CaRe.

Dois indivíduos jovens (B21 e B40) e não aparentados apresentaram características clínicas semelhantes e uma VUS em *HSPH1* (c.71_73delAAG, *inframe deletion*). Este gene (também conhecido como *HSP110*) têm sido associado com agressividade tumoral, incluindo em CCR (BERTHENET et al. 2017; ZAPPASODI

et al. 2015). *HSPH1* codifica uma chaperona molecular com propriedades anti-agregação e, por meio de sua interação com HSP70, participa do correto dobramento de proteínas recém-sintetizadas ou mal dobradas (BERTHENET et al. 2017). Essa proteína pode ser induzida por diferentes mecanismos de estresse, ajudando a célula a sobreviver a essas situações, por suas propriedades anti-apoptóticas (BERTHENET et al. 2017). O fato de HSPH1 desempenhar uma função importante na homeostase protéica e em vias proliferativas, como a via Wnt/ β -Catenina, explica como essa proteína pode estar ligada a agressividade tumoral. BERTHENET et al. (2017) mostraram que HSP110 promove o crescimento celular induzindo a ativação de STAT3 (transdutor de sinal e ativador da transcrição 3). Estudos prévios reportaram que tumores colorretais com instabilidade de microssatélite e uma mutação específica de perda de função em *HSP110* (T17) expressam uma forma truncada de HSP110, conhecida como HSP110DE9, que atua como um inibidor endógeno de HSP110 (DORARD et al. 2011; COLLURA et al. 2014). COLLURA et al. (2014) reportaram uma associação direta entre a inativação de HSP110 e excelente resposta a quimioterapia (5-FU e oxaliplatina). BERTHENET et al. (2017) validaram HSP110 e P-STAT3 como um marcador combinado para prognóstico desfavorável em pacientes com CCR e MSI expressando quantidades diferentes do inibidor de HSP110 (HSP110DE9). Em nosso estudo, ambos os pacientes com a variante *HSPH1* (c.71_73delAAG) apresentaram tumor com microssatélite estável, foram tratados com quimioterapia (B12: Flox e Folifiri; B40: Folfox+Avastin, Xelox+Avastin, 5FU/LV+Avastin, Xelox) e desenvolveram metástases. Não houve predição funcional desta variante pelo banco dnNFSP ou em literatura, mas os dois pacientes

apresentaram prognóstico desfavorável. Estudos funcionais devem elucidar o papel dessa variante germinativa em pacientes com CaRe.

Todos os genes identificados com variantes patogênicas em nosso estudo fazem parte de vias de reparo do DNA (MMR: *MSH2*, *MSH6* e *MLH1*; HR: *ATM* e *BRCA2*). A pesquisa de genes envolvidos no reparo de DNA tem revelado genes de predisposição ao câncer com baixa ou moderada penetrância (TURNBULL et al. 2018). A via MMR já é bem estabelecida no risco de desenvolver CCR e recentemente foram reportados que indivíduos com CCR são mais propensos a terem variantes germinativas em genes associados a via HR comparado com indivíduos sem câncer (GERMANO et al. 2018; ALDUBAYAN et al. 2018). Nós detectamos 39 alterações germinativas em genes relacionados à via HR e 50% (38/76) dos probandos apresentaram alguma variante em um destes genes. Os genes frequentemente alterados nesta via foram *ATM* (13/38: 34,2%) e *BRCA2* (6/38: 15,8%), nos quais foram identificadas também variantes de significado incerto. O estudo revelou três alterações presentes em mais de um paciente (*RAD51B*: c.1040A>G; *ATM*: c.8734A>G/c.640+32092T>C; *RAD50*: c.3253A>G) e cinco (13,1%) indivíduos com mais de uma alteração em diferentes genes da via HR (A9: *BRCA1*, *BRIP1* e *CHEK2*; A26: *BRCA2*, *BRIP1* e *POLE*; B17: *ATM* e *RAD51C*; B38: *BARD* e *CHEK2*; B39: *ATM* e *XRCC2*). Interessantemente, sete dos 76 pacientes (9,2%, casos A5, A6, A20, A26, B17, B24 e B29) não apresentaram alteração em nenhum outro gene além dos relacionados à via HR e ainda a única alteração identificada no indivíduo A6 foi uma variante patogênica em *BRCA2* (c.7819delA). Desta forma, as alterações germinativas em genes da via HR foram frequentes em pacientes com CaRe e, várias delas, tem um papel bem estabelecido no risco de desenvolvimento desta neoplasia.

Foi possível notar que os pacientes que apresentaram exclusivamente variantes germinativas em genes da via HR foram identificados com características clínicas desfavoráveis. Todos os pacientes foram diagnosticados com estadiamento clínico avançado (III/ IV), três (A6, A20 e B29) apresentaram invasão (linfática/ perineural), quatro (A5, A20, A26 e B17) tiveram metástase (pélvica/ pulmonar- colo uterino e vagina- ureter/ pulmonar/ partes moles- parede abdominal) e quatro (A5, A6, A26 e B17) foram a óbito pela doença. Estudos recentes têm reportado que alterações em genes da via HR podem prever a progressão do CCR e resposta a tratamento (HO et al; 2016; HO et al. 2017; CHEN et al. 2018; REILLY et al. 2019). Nós pudemos verificar que indivíduos que apresentaram variantes em genes da via HR apresentam menor sobrevida livre de doença. Esses dados sugerem que variantes germinativas em genes da via HR são potenciais biomarcadores para o CaRe e podem contribuir para o estabelecimento de terapias alvo-específicas nestes pacientes.

Em adição, têm sido reportado que variantes germinativas em genes da via HR aumentam o risco de câncer de mama, ovário, próstata e pâncreas (MAVADDAT et al. 2013). ALDUBAYAN et al. (2018) relataram que variantes patogênicas germinativas nos genes associados à via HR conferem um aumento relativo de 60% a 80% no risco de CCR e a inativação bialélica destes genes apontam novos candidatos para terapias alvo. Já foi observado que indivíduos com câncer de mama, ovário e próstata com variantes germinativas em genes da via HR respondem bem a quimioterapia baseada em platina e PARPi (FONG et al. 2009; TUTT et al. 2010; MATEO et al. 2015). Estudos pré-clínicos mostraram sensibilidade das linhagens celulares de CCR deficientes para a via HR, incluindo *ATM*, à PARPi, e estão em

andamento ensaios clínicos para avaliar a eficácia de PARPi em indivíduos com CCR (WANG et al. 2017).

Não foi possível observar associação significativa entre os dados clínicos e a sobrevida em relação as variantes encontradas em nosso estudo, provavelmente devido ao número limitado de amostras. Foi observado uma associação significativa comparando a presença de variantes nos genes MMR e pólipos; entretanto, o número de casos com a alteração foi muito limitado para conclusões. Nós também verificamos que indivíduos com variantes em genes da via HR apresentaram menor sobrevida livre de doença. De forma semelhante, o número de casos avaliados não é suficiente para confirmar essa observação.

A utilização de um painel multigênico para investigar indivíduos com predisposição ao CaRe que preenchem critérios clínicos para síndrome hereditária, revelou que uma proporção significativa deles não apresenta variantes patogênicas em genes tradicionalmente associados ao CCR ou são subdiagnosticados. Os nossos dados também apontam para necessidade de oferecer testes genéticos a indivíduos jovens com CaRe, independente de história familiar. Para o nosso conhecimento, esse é o primeiro estudo a reportar as variantes c.4303A>T, c.8122G>A, c.8734A>G e c.8840C>A/c.640+31056G>T em *ATM* em pacientes com câncer de reto, sugerindo que algumas dessas variantes podem conferir um risco aumentado para o CaRe. Em adição, esforços devem ser direcionados para reclassificação de variantes de significado incerto, pois essas variantes em *ATM*, *APC*, *POLD1*, *BRCA2*, *MLH3*, *MTHFR* e *HSPH1* parecem contribuir para o risco de desenvolvimento do câncer de reto.

Além da via MMR, a via HR também estava alterada em indivíduos com CaRe familiar e pode ter um potencial terapêutico nestes pacientes. Em conjunto, os nossos achados sugerem a ampliação de painéis de genes associados ao risco de desenvolvimento do câncer, incluindo os genes *ATM*, *BRCA2* e *MTHFR*.

7 CONCLUSÃO

- Variantes patogênicas ou *likely*-patogênicas foram responsáveis por aproximadamente 18% dos pacientes diagnosticados com CaRe, sendo mais comum em genes de alta e moderada penetrância (*MSH2*, *MUTYH* e *ATM*).
- Uma proporção significativa de indivíduos jovens (17%) com CaRe apresentaram variantes patogênicas ou *likely*-patogênicas que podem explicar a doença.
- Devido ao crescente número de indivíduos jovens diagnosticados com CaRe e alta frequência de variantes patogênicas e *likely*-patogênicas identificadas neste grupo de pacientes, estratégias para o diagnóstico precoce devem ser implementadas na rotina clínica.
- Genes de baixa (*MTHFR*) e moderada penetrância (*ATM*) parecem estar associados ao risco de desenvolvimento do câncer de reto e devem ser considerados na avaliação de risco para o desenvolvimento destes tumores.
- Os genes *ATM*, *BRCA2* e *MTHFR* foram comumente afetados em pacientes com CaRe e parecem contribuir para o maior risco desta neoplasia. As variantes identificadas em pacientes com CaRe nestes genes devem ser melhor exploradas para elucidar seu potencial patogênico e contribuir para o aconselhamento genético dos pacientes e seus familiares.
- As variantes de significado incerto nos genes *APC* (c.2942_2943insTA), *ATM* (c.4414T>G), *MTHFR* (c.1555C>T), *MUTYH* (c.1227_1228dupGG) e *POLD1* (c.353C>T) demonstraram co-segregar com a doença (câncer ou polipose) e portanto poderiam ser reclassificadas como variantes *likely*-patogênicas.

- Os dados reforçam a importância do rastreamento para CaRe, principalmente em indivíduos jovens e a necessidade de ampliar o painel de genes utilizados atualmente na prática clínica, incluindo além de genes associados ao CCR, *ATM*, *BRCA2* e *MTHFR*.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdelsattar ZM, Wong SL, Regenbogen SE, Jomaa DM, Hardiman KM, Hendren S. Colorectal cancer outcomes and treatment patterns in patients too young for average-risk screening. **Cancer** 2016; 122:929-34.

Abedalthagafi M. Constitutional mismatch repair-deficiency: current problems and emerging therapeutic strategies. **Oncotarget** 2018; 9:35458-69.

Adachi M, Banno K, Masuda K, et al. Carcinoma of the lower uterine segment diagnosed with Lynch syndrome based on MSH6 germline mutation: a case report. **J Obstet Gynaecol Res** 2017; 43:416-20.

Agalliu I, Gern R, Leanza S, Burk RD. Associations of high-grade prostate cancer with BRCA1 and BRCA2 founder mutations. **Clin Cancer Res** 2009; 15:1112-20.

Ahn JB, Chung WB, Maeda O, et al. DNA methylation predicts recurrence from resected stage III proximal colon cancer. **Cancer** 2011; 117:1847-54.

Ajay SS, Parker SC, Abaan HO, Fajardo KV, Margulies EH. Accurate and comprehensive sequencing of personal genomes. **Genome Res** 2011; 21:1498-505.

AlDubayan SH, Giannakis M, Moore ND, et al. Inherited DNA-repair defects in colorectal cancer. **Am J Hum Genet** 2018; 102:401-14.

Antelo M, Balaguer F, Shia J, et al. A high degree of LINE-1 hypomethylation is a unique feature of early-onset colorectal cancer. **PLoS One** 2012; 7:e45357.

Aparicio T, Baer R, Gautier J. DNA double-strand break repair pathway choice and cancer. **DNA Repair (Amst)** 2014; 19:169-75.

Aretz S, Genuardi M, Hes FJ. Clinical utility gene card for: MUTYH-associated polyposis (MAP), autosomal recessive colorectal adenomatous polyposis, multiple colorectal adenomas, multiple adenomatous polyps (MAP)-update 2012. **Eur J Hum Genet** 2013; 21(1): doi:10.1038/ejhg.2012.163.

Argillander TE, Koornstra JJ, van Kouwen M, et al. Features of incident colorectal cancer in Lynch syndrome. **United Eur Gastroenterol J** 2018; 6:1215-22.

Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. **Gut** 2017; 66:683-91.

Baba Y, Huttenhower C, Nosho K, et al. Epigenomic diversity of colorectal cancer indicated by LINE-1 methylation in a database of 869 tumors. **Mol Cancer** 2010; 9:125.

Ballester V, Rashtak S, Boardman L. Clinical and molecular features of young-onset colorectal cancer. **World J Gastroenterol** 2016; 22:1736-44.

Bell O, Tiwari VK, Thoma NH, Schubeler D. Determinants and dynamics of genome accessibility. **Nat Rev Genet** 2011; 12:554-64.

Bellido F, Pineda M, Aiza G, et al. POLE and POLD1 mutations in 529 kindred with familial colorectal cancer and/or polyposis: review of reported cases and recommendations for genetic testing and surveillance. **Genet Med** 2016; 18:325-32.

Berthenet K, Bokhari A, Lagrange A, et al. HSP110 promotes colorectal cancer growth through STAT3 activation. **Oncogene** 2017; 36:2328-36.

Boland CR, Shike M. Report from the Jerusalem workshop on Lynch syndrome-hereditary nonpolyposis colorectal cancer. **Gastroenterology** 2010; 138:2197.e1–2197.e7

Bouuaert CC, Keeney S. Distinct DNA-binding surfaces in the ATPase and linker domains of MutL γ determine its substrate specificities and exert separable functions in meiotic recombination and mismatch repair. **PLoS Genet** 2017; 13:e1006974.

Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA Cancer J Clin** 2018; 68:394-424.

Broderick P, Dobbins SE, Chubb D, et al. Validation of recently proposed colorectal cancer susceptibility gene variants in an analysis of families and patients-a systematic review. **Gastroenterology** 2017; 152:75-7.

Brosens LA, Offerhaus GJ, Giardiello FM. Hereditary colorectal cancer: genetics and screening. **Surg Clin North Am** 2015; 95:1067-80.

Carethers JM, Stoffel EM. Lynch syndrome and lynch syndrome mimics: the growing complex landscape of hereditary colon cancer. **World J Gastroenterol** 2015; 21:9253-61.

Carneiro da Silva F, Ferreira JR, Torrezan GT, et al. Clinical and molecular characterization of Brazilian Patients Suspected to Have Lynch Syndrome. **PLoS One** 2015; 10:e0139753.

Castillejo A, Vargas G, Castillejo MI, et al. Prevalence of germline MUTYH mutations among Lynch-like syndrome patients. **Eur J Cancer** 2014; 50:2241-50.

Cavanagh H, Rogers KM. The role of BRCA1 and BRCA2 mutations in prostate, pancreatic and stomach cancers. **Hered Cancer Clin Pract** 2015; 13:16.

Chang DT, Pai RK, Rybicki LA, et al. Clinicopathologic and molecular features of sporadic early-onset colorectal adenocarcinoma: an adenocarcinoma with frequent signet ring cell differentiation, rectal and sigmoid involvement, and adverse morphologic features. **Mod Pathol** 2012; 25:1128-39.

Chen E, Xu X, Liu T. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer and cancer syndromes: recent basic and clinical discoveries. **J Oncol** 2018; 2018:3979135.

Chen C, Wang Y, Mei JF, et al. Targeting RAD50 increases sensitivity to radiotherapy in colorectal cancer cells. **Neoplasia** 2018; 65:75-80.

Ciccio A, Elledge SJ. The DNA damage response: making it safe to play with knives. **Mol Cell** 2010; 40:179-204.

Claes K, Depuydt J, Taylor AM, et al. Variant ataxia telangiectasia: clinical and molecular findings and evaluation of radiosensitive phenotypes in a patient and relatives. **Neuromolecular Med** 2013; 15:447-57.

Collura A, Lagrange A, Svrcek M, et al. Patients with colorectal tumors with microsatellite instability and large deletions in HSP110 T17 have improved response to 5-fluorouracil-based chemotherapy. **Gastroenterology** 2014; 146:401-11.

Cortes-Ciriano I, Lee S, Park WY, Kim TM, Park PJ. A molecular portrait of microsatellite instability across multiple cancers. **Nat Commun** 2017; 8:15180.

Cragun D, Radford C, Dolinsky JS, Caldwell M, Chao E, Pal T. Panel-based testing for inherited colorectal cancer: a descriptive study of clinical testing performed by a US laboratory. **Clin Genet** 2014; 86:510-20.

Cremona CA, Behrens A. ATM signalling and cancer. **Oncogene** 2014; 33:3351-60.

Cress RD, Morris C, Ellison GL, Goodman MT. Secular changes in colorectal cancer incidence by subsite, stage at diagnosis, and race/ ethnicity, 1992-2001. **Cancer** 2006; 107 Suppl 5:1142-52.

Crosbie AB, Roche LM, Johnson LM, Pawlish KS, Paddock LE, Stroup AM. Trends in colorectal cancer incidence among younger adults-Disparities by age, sex, race, ethnicity, and subsite. **Cancer Med** 2018; 7:4077-86.

de Rosa N, Rodriguez-Bigas MA, Chang GJ, et al. DNA mismatch repair deficiency in rectal cancer: benchmarking its impact on prognosis, neoadjuvant response prediction, and clinical cancer genetics. **J Clin Oncol** 2016; 34:3039-46.

Deen KI, Silva H, Deen R, et al. Colorectal cancer in the young, many questions, few answers. **World J Gastrointest Oncol** 2016; 8:481-8.

De Lellis L, Aceto GM, Curia MC, et al. Integrative analysis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer: the contribution of allele-specific expression and other assays to diagnostic algorithms. **PLoS One** 2013; 8:e81194.

DeRycke MS, Gunawardena SR, Middha S, et al. Identification of novel variants in colorectal cancer families by high-throughput exome sequencing. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2013; 22:1239-51.

DeRycke MS, Gunawardena S, Balcom JR, et al. Targeted sequencing of 36 known or putative colorectal cancer susceptibility genes. **Mol Genet Genomic Med** 2017; 5:553-69.

Desvillechabrol D, Bouchier C, Kennedy S, Cokelaer T. Detection and characterization of low and high genome coverage regions using an efficient running median and a double threshold approach. **bioRxiv** 2016; Available from: <URL:https://bit.ly/2kT6Ag6> [2019 jan 12]

Dominguez-Valentin M, Therkildsen C, Da Silva S, et al. Familial colorectal cancer type X: genetic profiles and phenotypic features. **Mod Pathol** 2015; 28:30-6.

Dorard C, de Thonel A, Collura A, et al. Expression of a mutant HSP110 sensitizes colorectal cancer cells to chemotherapy and improves disease prognosis. **Nat Med** 2011; 17:1283-9.

Eid J, Fehr A, Gray J, et al. Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules. **Science** 2009; 323:133-8.

Eisenstein M. Oxford Nanopore announcement sets sequencing sector abuzz **Nat Biotechnol** 2012; 30:295-6.

Emami N, Saadat I, Omidvari S. Susceptibility to colorectal cancer and two genetic polymorphisms of XRCC4. **Pathol Oncol Res** 2015; 21:881-5.

Esteban-Jurado C, Vila-Casadesús M, Garre P, et al. Whole-exome sequencing identifies rare pathogenic variants in new predisposition genes for familial colorectal cancer. **Genet Med** 2015; 17:131-42.

Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell** 1990; 61:759-67.

Ferlay J, Ervik M, Lam F, et al. **Global cancer observatory: cancer today**. Lyon, IARC; 2018. Available from: <URL:<https://gco.iarc.fr/today>>. [2018 dez 06].

Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin DM, Piñeros M, Znaor A, Bray F. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. **Int J Cancer** 2019; 144:1941-53.

Fievet A, Mouret-Fourme E, Colas C, de Pauw A, Stoppa-Lyonnet D, Buecher B. Prevalence of pathogenic variants of FAN1 in More Than 5000 patients assessed for genetic predisposition to colorectal, breast, ovarian, or other cancers. **Gastroenterology** 2019; 156:1919-20.

Fong PC, Boss DS, Yap TA, et al. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. **N Engl J Med** 2009; 361:123-34.

Ford MM. Translational research in familial colorectal cancer syndromes. **Clin Colon Rectal Surg** 2018; 31:161-7.

Fostira F, Thodi G, Sandaltzopoulos R, Fountzilas G, Yannoukakos D. Mutational spectrum of APC and genotype-phenotype correlations in Greek FAP patients. **BMC Cancer** 2010; 10:389.

Fujiyoshi K, Yamamoto G, Takenoya T, et al. Metastatic pattern of stage IV colorectal cancer with highfrequency microsatellite instability as a prognostic factor. **Anticancer Res** 2017; 37:239-47.

Gallego CJ, Shirts BH, Bennette CS et al. Next-generation sequencing panels for the diagnosis of colorectal cancer and polyposis syndromes: a cost-effectiveness analysis. **J Clin Oncol** 2015; 33:2084-91.

Garre P, Martín L, Sanz J, et al. BRCA2 gene: a candidate for clinical testing in familial colorectal cancer type X. **Clin Genet** 2015; 87:582-7.

Germano G, Amirouchene-Angelozzi N, Rospo G, Bardelli A. The clinical impact of the genomic landscape of mismatch repair-deficient Cancers. **Cancer Discov** 2018; 8:1518-28.

Giardiello FM, Allen JI, Axilbund JE, et al. Guidelines on genetic evaluation and management of Lynch syndrome: a consensus statement by the US Multi-Society Task Force on colorectal cancer. **Gastroenterology** 2014; 147:502-26.

Giglia MD, Chu DI. Familial colorectal cancer: understanding the alphabet soup. **Clin Colon Rectal Surg** 2016; 29:185-95.

Giráldez MD, Balaguer F, Bujanda L, et al. MSH6 and MUTYH deficiency is a frequent event in early-onset colorectal cancer. **Clin Cancer Res** 2010; 16:5402-13.

Goel A, Xicola RM, Nguyen TP, et al. Aberrant DNA methylation in hereditary nonpolyposis colorectal cancer without mismatch repair deficiency. **Gastroenterology** 2010; 138:1854-62.

Goh G, Choi M. Application of whole exome sequencing to identify disease-causing variants in inherited human diseases. **Genomics Inform** 2012; 10:214-9.

Goldvaser H, Purim O, Kundel Y, et al. Colorectal cancer in young patients: is it a distinct clinical entity? **Int J Clin Oncol** 2016; 21:684-95.

Goncalves MD, Lu C, Tutnauer J, et al. High-fructose corn syrup enhances intestinal tumor growth in mice. **Science** 2019; 363:1345-9.

Gong R, He Y, Liu XY, et al. Mutation spectrum of germline cancer susceptibility genes among unselected Chinese colorectal cancer patients. **Cancer Manag Res** 2019; 11:3721-39.

González S, Blanco I, Campos O; et al. Founder mutation in familial adenomatous polyposis (FAP) in the Balearic Islands. **Cancer Genet Cytogenet** 2005; 158:70-4.

Gonzalez-Pons M, Cruz-Correa M. Colorectal cancer biomarkers: where are we now? **Biomed Res Int** 2015; 2015:149014.

Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. **Nat Rev Gen** 2016; 17:333-51.

Guarinos C, Sánchez-Fortún C, Rodríguez-Soler M, et al. Clinical subtypes and molecular characteristics of serrated polyposis syndrome. **Clin Gastroenterol Hepatol** 2013; 11:705-11.

Gylfe AE, Katainen R, Kondelin J, et al. Eleven candidate susceptibility genes for common familial colorectal cancer. **PLoS Genet** 2013; 9:e1003876.

Hanahan D; Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell** 2011; 144:646-74.

Hansen MF, Johansen J, Sylvander AE, et al. Use of multigene-panel identifies pathogenic variants in several CRC-predisposing genes in patients previously tested for Lynch Syndrome. **Clin Genet** 2017; 92:405-14.

Hasan T, Arora R, Bansal AK, Bhattacharya R, Sharma GS, Singh LR. Disturbed homocysteine metabolism is associated with cancer. **Exp Mol Med** 2019; 51:21.

Hause RJ, Pritchard CC, Shendure J, Salipante SJ. Classification and characterization of microsatellite instability across 18 cancer types. **Nat Med** 2016; 22:1342-50.

He L, Shen Y. MTHFR C677T polymorphism and breast, ovarian cancer risk: a meta-analysis of 19,260 patients and 26,364 controls. **Onco Targets Ther** 2017; 10:227-38.

Hendriks YM, de Jong AE, Morreau H, et al. Diagnostic approach and management of Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma): a guide for clinicians. **CA Cancer J Clin** 2006; 56:213-25.

Heijink DM, de Vries EG, Koornstra JJ, et al. Perspectives for tailored chemoprevention and treatment of colorectal cancer in Lynch syndrome. **Crit Rev Oncol Hematol** 2011; 80:264-77.

Ho V, Chung L, Revoltar M, Lim SH, Tut TG, Abubakar A, et al. MRE11 and ATM expression levels predict rectal cancer survival and their association with radiotherapy response. **PLoS One** 2016; 11:e0167675.

Ho V, Chung L, Singh A, et al. Early postoperative low expression of RAD50 in rectal cancer patients associates with disease-free survival. **Cancers (Basel)** 2017; 9:E163.

Hollestelle A, Wasielewski M, Martens JW, Schutte M. Discovering moderate-risk breast cancer susceptibility genes. **Curr Opin Genet Dev** 2010; 20:268-76.

Howlander N, Noone AM, Krapcho M, et al. **SEER Cancer Statistics Review, 1975-2013**. Bethesda, MD: National Cancer Institute; 2016.

Imperiale TF, Ransohoff DF, Itzkowitz SH. Multitarget stool DNA testing for colorectal-cancer screening. **N Engl J Med** 2014; 371:187-8.

Jarry J, Brunet JS, Laframboise R, et al. A survey of APC mutations in Quebec. **Fam Cancer** 2011; 10:659-65.

Jasperson KW, Tuohy TM, Neklason DW, et al. Hereditary and familial colon cancer. **Gastroenterology** 2010; 138:2044-58.

Jass JR. Colorectal polyposis: from phenotype to diagnosis. **Pathol Res Pract** 2008; 204:431-47.

Jerzak KJ, Mancuso T, Eisen A. Ataxia-telangiectasia gene (ATM) mutation heterozygosity in breast cancer: a narrative review. **Curr Oncol** 2018; 25:e176-e180.

Jongmans MC, Loeffen JL, Waanders E, et al. Recognition of genetic predisposition in pediatric cancer patients: an easy-to-use selection tool. **Eur J Med Genet** 2016; 59:116-25.

Katona BW, Stadler ZK, Robson ME, Domchek SM. RE: BRCA1 and BRCA2 Gene Mutations and Colorectal Cancer Risk: Systematic Review and Meta-analysis. **J Natl Cancer Inst** 2019; 111:522-23.

Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. **J Am Stat Assoc** 1958; 53:457-81.

Kayser K, Degenhardt F, Holzapfel S, et al. Copy number variation analysis and targeted NGS in 77 families with suspected Lynch syndrome reveals novel potential causative genes. **Int J Cancer** 2018; 143:2800-13.

Khan SA, Morris M, Idrees K, et al. Colorectal cancer in the very young: a comparative study of tumor markers, pathology and survival in early onset and adult onset patients. **J Pediatr Surg** 2016; 51:1812-7.

Kinnersley B, Chubb D, Dobbins SE, et al. Correspondence: SEMA4A variation and risk of colorectal cancer. **Nat Commun** 2016; 7:10611.

Kokelaar RF, Evans MD, Davies M, Harris DA, Beynon J. Locally advanced rectal cancer: management challenges. **Onco Targets Ther** 2016; 9:6265-72.

Korhonen MK, Vuorenmaa E, Nyström M. The first functional study of MLH3 mutations found in cancer patients. **Genes Chromosomes Cancer** 2008; 47:803-9.

Kurian AW, Hare EE, Mills MA, et al. Clinical evaluation of a multiple-gene sequencing panel for hereditary cancer risk assessment. **J Clin Oncol** 2014; 32:2001-9.

Kurzawski G. Some aspects of molecular diagnostics in Lynch syndrome. **Hereditary Cancer Clin Pract** 2006; 4:197-205.

Lavin MF. Ataxia-telangiectasia: From a rare disorder to a paradigm for cell signalling and cancer. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2008, 9:759-69.

Lee HC, Lai K, Lorenc MT, Imelfort M, Duran C, Edwards D. Bioinformatics tools and databases for analysis of next-generation sequence data. **Brief Funct Genomics** 2012; 11:12-24.

Leoz ML, Carballal S, Moreira L, Ocana T, Balaguer F. The genetic basis of familial adenomatous polyposis and its implications for clinical practice and risk management. **Appl Clin Genet** 2015; 8:95-107.

Levine JS, Ahnen DJ. Adenomatous polyps of the colon. **N Engl J Med** 2006; 355:2551-7.

Levy SE, Myers RM. Advancements in Next-Generation Sequencing. **Annu Rev Genomics Hum Genet** 2016; 17:95-115.

Li X, Yao X, Wang Y, et al. MLH1 promoter methylation frequency in colorectal cancer patients and related clinicopathological and molecular features. **PLoS One** 2013; 8:e59064.

Limburg PJ, Harmsen WS, Chen HH, et al. Prevalence of alterations in DNA mismatch repair genes in patients with young-onset colorectal cancer. **Clin Gastroenterol Hepatol** 2011; 9:497-502.

Lindor NM, Rabe K, Petersen GM, et al. Lower Cancer Incidence in Amsterdam-I Criteria Families Without Mismatch Repair Deficiency. **JAMA** 2005; 293:1979-85.

Liu HX, Zhou XL, Liu T, Werelius B, Lindmark G, Dahl N, et al. The role of hMLH3 in familial colorectal cancer. **Cancer Res** 2003; 63:1894-99.

Liu PH, Wu K, Ng K, Zauber AG, Nguyen LH, Song M, et al. Association of obesity with risk of early-onset colorectal cancer among women. **JAMA Oncol** 2019; 5:37-44.

Loeb LA. A mutator phenotype in cancer. **Cancer Res** 2001; 61:3230-9.

Lok BH, Powell SN. Molecular pathways: understanding the role of Rad52 in homologous recombination for therapeutic advancement. **Clin Cancer Res** 2012; 18:6400-6.

Lord CJ, Ashworth A. The DNA damage response and cancer therapy. **Nature** 2012; 481:287-94.

Lubbe SJ, Pittman AM, Matijssen C, et al. Evaluation of germline BMP4 mutation as a cause of colorectal cancer. **Hum Mutat** 2011; 32:E1928-38.

Lui RN, Tsoi KKF, Ho JMW, Lo CM, Chan FCH, Kyaw MH, Sung JJY. Global increasing incidence of young-onset colorectal cancer across 5 Continents: a Joinpoint regression analysis of 1,922,167 cases. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2019; 28:1275-82.

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

Lynch HT, Snyder CL, Shaw TG, et al. Milestones of Lynch syndrome: 1895-2015. **Nat Rev Cancer** 2015; 15:181-94.

Lv XP. Gastrointestinal tract cancers: Genetics, heritability and germ line mutations. **Oncol Lett** 2017; 13:1499-508.

Magi A, Benelli M, Gozzini A, Girolami F, Torricelli F, Brandi ML. Bioinformatics for next generation sequencing data. **Genes** 2010; 1:294-307.

Majewski J, Schwartzentruber J, Lalonde E, Montpetit A, Jabado N. What can exome sequencing do for you? **J Med Genet** 2011; 48:580-9.

Mangold E, Pagenstecher C, Friedl W, et al. Spectrum and frequencies of mutations in MSH2 and MLH1 identified in 1,721 German families suspected of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. **Int J Cancer** 2005; 116:692-702.

Marra G, Jiricny J. Multiple colorectal adenomas-is their number up? **N Engl J Med** 2003; 348:845-7.

Martin-Morales L, Rofes P, Diaz-Rubio E, et al. Novel genetic mutations detected by multigene panel are associated with hereditary colorectal cancer predisposition. **PLoS One** 2018; 13:e0203885.

Mašek J, Andersson ER. The developmental biology of genetic Notch disorders. **Development** 2017; 144:1743-63.

Mateo J, Carreira S, Sandhu S, et al. DNA-repair defects and olaparib in metastatic prostate cancer. **N Engl J Med** 2015; 373:1697-708.

Mavaddat N, Peock S, Frost D, et al. Cancer risks for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from prospective analysis of EMBRACE. **J Natl Cancer Inst** 2013; 105:812-22.

Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. **Nat Rev Genet** 2010; 11:31-46.

Middeldorp A, van Eijk R, Oosting J, et al. Increased frequency of 20q gain and copy-neutral loss of heterozygosity in mismatch repair proficient familial colorectal carcinomas. **Int J Cancer** 2012; 130:837-46.

Mitui M, Campbell C, Coutinho G, et al. Independent mutational events are rare in the ATM gene: haplotype prescreening enhances mutation detection rate. **Hum Mutat** 2003; 22:43-50.

Morganti S, Tarantino P, Ferraro E, et al. Complexity of genome sequencing and reporting: Next generation sequencing (NGS) technologies and implementation of precision medicine in real life. **Crit Rev Oncol Hematol** 2019; 133:171-82.

Mork ME, You YN, Ying J, et al. High prevalence of hereditary cancer syndromes in adolescents and young adults with colorectal cancer. **J Clin Oncol** 2015; 33:3544-9.

[NCCN] National Comprehensive Cancer Network. **Familial and Genetic High-Risk Assessment: Colorectal**, version 2.2017, p.96. Available from: <URL:<https://bit.ly/2kTddz1>> [2019 abr 15]

Nielsen M, Morreau H, Vasen HF, Hes FJ. MUTYH-associated polyposis (MAP). **Crit Rev Oncol Hematol** 2011; 79:1-16.

Nieminen TT, O'Donohue MF, Wu Y, et al. Germline mutation of RPS20, encoding a ribosomal protein, causes predisposition to hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma without DNA mismatch repair deficiency. **Gastroenterology** 2014; 147:595-598.e5.

Ntziachristos P, Lim JS, Sage J, Aifantis I. From fly wings to targeted cancer therapies: a centennial for Notch signaling. **Cancer Cell** 2014; 25:318–34.

O'Connell JB, Maggard MA, Liu JH, Etzioni DA, Livingston EH, Ko CY. Rates of colon and rectal cancers are increasing in young adults. **Am Surg** 2003; 69:866-72.

O'Connell JB, Maggard MA, Livingston EH, et al. Colorectal cancer in the young. **Am J Surg** 2004; 187:343-8.

Oey H, Whitelaw E. On the meaning of the word 'epimutation'. **Trends Genet** 2014; 30:519-20.

Ogino S, Nosho K, Kirkner GJ, et al. A cohort study of tumoral LINE-1 hypomethylation and prognosis in colon cancer. **J Natl Cancer Inst** 2008; 100:1734-8.

Oh M, McBride A, Yun S, et al. BRCA1 and BRCA2 gene mutations and colorectal cancer risk: systematic review and meta-analysis. **J Natl Cancer Inst** 2018; 110:1178-89.

Olkinuora A, Nieminen TT, Mårtensson E, et al. Biallelic germline nonsense variant of MLH3 underlies polyposis predisposition. **Genet Med** 2019; 21:1868-73.

Ow SGW, Ong PY, Lee SC. Discoveries beyond BRCA1/2: Multigene testing in an Asian multi-ethnic cohort suspected of hereditary breast cancer syndrome in the real world. **PLoS One** 2019; 14:e0213746.

Pearlman R, Frankel WL, Swanson B, et al. Prevalence and spectrum of germline cancer susceptibility gene mutations among patients with early-onset colorectal cancer. **JAMA Oncol** 2017; 3:464-71

Peto R, Peto J. Asymptotically efficient rank invariant test procedures. **J Royal Stat Soc** 1972; 135:185-207.

Picó MD, Castillejo A, Murcia Ó, et al. Clinical and pathological characterization of lynch-like syndrome. **Clin Gastroenterol Hepatol** 2019; Epub 2019 Jun 17.

Pylkäs K, Tommiska J, Syrjäkoski K, et al. Evaluation of the role of Finnish ataxia-telangiectasia mutations in hereditary predisposition to breast cancer. **Carcinogenesis** 2007; 28:1040-5.

Pillai S, Gopalan V, Lam AK. Review of sequencing platforms and their applications in pheochromocytoma and paragangliomas. **Crit Rev Oncol Hematol** 2017; 116:58-67.

Pirzada MT, Ahmed MJ, Muzzafar A, et al. Rectal carcinoma: demographics and clinicopathological features from pakistani population perspective. **Cureus** 2017; 9:e1375.

Plawski A, Slomski R. APC gene mutations causing familial adenomatous polyposis in Polish patients. **J Applied Genet** 2008; 49:407-14.

Provenzale D, Jasperson K, Ahnen DJ, et al. National comprehensive cancer network. Colorectal Cancer Screening, Version 1.2015. **J Natl Compr Canc Netw** 2015; 13:959-68.

Rahner N, Steinke V. Hereditary cancer syndromes. **Dtsch Arztebl Int** 2008; 105:706-14.

Reilly NM, Novara L, Di Nicolantonio F, Bardelli A. Exploiting DNA repair defects in colorectal cancer. **Mol Oncol** 2019; 13:681-700.

Rivera B, González S, Sánchez-Tome E, et al. Clinical and genetic characterization of classical forms of familial adenomatous polyposis: a Spanish population study. **Ann Oncol** 2011; 22:903-9.

Rosner G, Gluck N, Carmi S, et al. POLD1 and POLE Gene Mutations in Jewish Cohorts of Early-Onset Colorectal Cancer and of Multiple Colorectal Adenomas. **Dis Colon Rectum** 2018; 61:1073-9.

Rossi BM, Palmero EI, López-Kostner F, et al. A survey of the clinicopathological and molecular characteristics of patients with suspected Lynch syndrome in Latin America. **BMC Cancer** 2017; 17:623.

Roy R, Chun J, Powell SN. BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. **Nat Rev Cancer** 2011; 12:68-78.

Rumilla K, Schowalter KV, Lindor NM, et al. Frequency of deletions of EPCAM (TACSTD1) in MSH2-associated Lynch syndrome cases. **J Mol Diagn** 2011; 13:93-9.

Sargent DJ, Marsoni S, Monges G, et al. Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer. **J Clin Oncol** 2010; 28:3219-26.

Saridaki Z, Souglakos J, Georgoulas V. Prognostic and predictive significance of MSI in stages II/III colon cancer. **World J Gastroenterol** 2014; 20:6809-14.

Schulz E, Klampfl P, Holzapfel S, et al. Germline variants in the SEMA4A gene predispose to familial colorectal cancer type X. **Nat Commun** 2014; 5:5191.

Segev L, Kalady MF, Church JM. Left-sided dominance of early-onset colorectal cancers: a rationale for screening flexible sigmoidoscopy in the young. **Dis Colon Rectum** 2018; 61:897-902.

Seguí N, Mina LB, Lázaro C, et al. Germline Mutations in FAN1 Cause Hereditary Colorectal Cancer by Impairing DNA Repair. **Gastroenterology** 2015; 149:563-6.

Sepulveda AR, Hamilton SR, Allegra CJ, et al. Molecular Biomarkers for the Evaluation of Colorectal Cancer: Guideline From the American Society for Clinical Pathology, College of American Pathologists, Association for Molecular Pathology, and the American Society of Clinical Oncology. **J Clin Oncol** 2017; 35:1453-86.

Serrati S, De Summa S, Pilato B, et al. Next-generation sequencing: advances and applications in cancer diagnosis. **Onco Targets Ther** 2016; 9:7355-65.

Shyr D, Liu Q. Next generation sequencing in cancer research and clinical application. **Biol Proced Online** 2013; 15:4.

Siegel RL, Jemal A, Ward EM. Increase in Incidence of Colorectal Cancer Among Young Men and Women in the United States. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2009; 18:1695-8.

Siegel RL, Miller KD, Fedewa SA, et al. Colorectal cancer statistics, 2017. **CA Cancer J Clin** 2017; 67:177-93.

Sims D, Sudbery I, Ilott NE, Heger A, Ponting CP. Sequencing depth and coverage: key considerations in genomic analyses. **Nat Rev Genet** 2014; 15:121-32.

Stoffel EM, Kastrinos F. Familial colorectal cancer, beyond Lynch syndrome. **Clin Gastroenterol Hepatol** 2014; 12:1059-68.

Stoffel EM, Koeppe E, Everett J, Ulintz P, Kiel M, Osborne J, et al. Germline genetic features of young individuals with colorectal cancer. **Gastroenterology** 2018; 154:897-905.

Stoffel EM, Murphy CC. epidemiology and mechanisms of the increasing incidence of colon and rectal cancers in young adults. **Gastroenterology** 2019; Epub 2019 Aug 5.

Strate LL, Syngal S. Hereditary colorectal cancer syndromes. **Cancer Causes Control** 2005; 16:201-13.

Sung P, Klein H. Mechanism of homologous recombination: mediators and helicases take on regulatory functions. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2006; 7:739-50.

Tavtigian SV, Oefner PJ, Babikyan D, et al. Rare, evolutionarily unlikely missense substitutions in ATM confer increased risk of breast cancer. **Am J Hum Genet** 2009; 85:427-46.

Thorstenson YR, Roxas A, Kroiss R, et al. Contributions of ATM mutations to familial breast and ovarian cancer. **Cancer Res** 2003; 63:3325-33.

Tomlinson IP, Carvajal-Carmona LG, Dobbins SE, et al. Multiple common susceptibility variants near BMP pathway loci GREM1, BMP4, and BMP2 explain part of the missing heritability of colorectal cancer. **PLoS Genet** 2011; 7:e1002105.

Tung N, Lin NU, Kidd J, et al. Frequency of germline mutations in 25 cancer susceptibility genes in a sequential series of patients with breast cancer. **J Clin Oncol** 2016; 34:1460-8.

Turajlic S, Litchfield K, Xu H, et al. Insertion-and-deletion-derived tumour-specific neoantigens and the immunogenic phenotype: a pan-cancer analysis. **Lancet Oncol** 2017; 18:1009-21.

Turnbull C, Sud A, Houston RS. Cancer genetics, precision prevention and a call to action. **Nat Genet** 2018; 50:1212-8.

Tutt A, Robson M, Garber JE, et al. Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and advanced breast cancer: a proof-of-concept trial. **Lancet** 2010; 376:235-44.

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

Valle L, de Voer RM, Goldberg Y, et al. Update on genetic predisposition to colorectal cancer and polyposis. **Mol Aspects Med** 2019; 69:10-26.

Vargas-Parra GM, González-Acosta M, Thompson BA, et al. Elucidating the molecular basis of MSH2-deficient tumors by combined germline and somatic analysis. **Int J Cancer** 2017; 141:1365-80.

Vasen HFA, Mecklin JP, Meera Khan P, et al. The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer. **Dis Colon Rectum** 1991; 34:424–5.

Vasen HFA, Watson P, Mecklin JP, et al. New criteria for hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative Group on HNPCC (ICG-HNPCC). **Gastroenterology** 1999; 116:1453–6.

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.

Villacis RA, Miranda PM, Gomy I, et al. Contribution of rare germline copy number variations and common susceptibility loci in Lynch syndrome patients negative for mutations in the mismatch repair genes. **Int J Cancer** 2016; 138:1928-35.

Vinson KE, George DC, Fender AW, Bertrand FE, Sigounas G. The Notch pathway in colorectal cancer. **Int J Cancer** 2016; 138: 1835-42.

Wang C, Jette N, Moussienko D, Bebb DG, Lees-Miller SP. ATM-deficient colorectal cancer cells are sensitive to the PARP inhibitor olaparib. **Transl Oncol** 2017; 10:190-6.

Walsh T, Casadei S, Lee MK, et al. Mutations in 12 genes for inherited ovarian, fallopian tube, and peritoneal carcinoma identified by massively parallel sequencing. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2011; 108:18032-7.

Walsh CS. Two decades beyond BRCA1/2: Homologous recombination, hereditary cancer risk and a target for ovarian cancer therapy. **Gynecol Oncol** 2015; 137:343-50.

Wen H, Kim YC, Snyder C, et al. Family-specific, novel, deleterious germline variants provide a rich resource to identify genetic predispositions for BRCAx familial breast cancer. **BMC Cancer** 2014; 14:470.

World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research. Diet, Nutrition, Physical Activity and Cancer: a Global perspective. Continuous Update Project Report 2018. Disponível em: dietandcancerreport.org. [2019 jan 12]

Wu Y, Berends MJ, Sijmons RH, et al. A role for MLH3 in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. **Nat Genet** 2001; 29:137-8.

Wu K, Keum N, Nishihara R, Giovannucci EL. Cancers of the colon and rectum. In: Thun MJ, Linet MS, Cerhan JR, Haiman CA, Schottenfeld D, editors. **Cancer epidemiology and prevention**. 4th ed. New York, NY: Oxford University Press; 2018. p.681-706.

Yang H, Shi L, Wang Y, Duan G, Wang Y. RE: BRCA1 and BRCA2 gene mutations and colorectal cancer risk: systematic review and meta-analysis. **J Natl Cancer Inst** 2019; 112:djz162.

Yurgelun MB, Allen B, Kaldate RR, et al. Identification of a variety of mutations in cancer predisposition genes in patients with suspected lynch syndrome. **Gastroenterology** 2015; 149:604-13.

Yurgelun MB, Kulke MH, Fuchs CS, Allen BA, Uno H, Hornick JL, et al. Cancer susceptibility gene mutations in individuals with colorectal cancer. **J Clin Oncol** 2017; 35:1086-95.

Yurgelun MB, Hampel H. Recent advances in lynch syndrome: diagnosis, treatment, and cancer prevention. **Am Soc Clin Oncol Educ Book** 2018; 38:101-9.

Zappasodi R, Ruggiero G, Guarnotta C, et al. HSPH1 inhibition downregulates Bcl-6 and c-Myc and hampers the growth of human aggressive B-cell non-Hodgkin lymphoma. **Blood** 2015; 125:1768-71.

Zhang JX, Fu L, de Voer RM, et al. Candidate colorectal cancer predisposing gene variants in Chinese early-onset and familial cases. **World J Gastroenterol** 2015; 21:4136-49.

Zhou L, Xie J, Gu EL, et al. Common genetic variant on BMP4 contributes to colorectal adenoma and cancer: a meta-analysis based on 15 studies. **Cytokine** 2015; 72:154-9.

Zhou H, Gao M, Skolnick J. ENTPRISE-X: Predicting disease-associated frameshift and nonsense mutations. **PLoS One** 2018; 13:e0196849.

Zhu F, Pan D, Zhang H, Ye Q, Xu P, Pan J. Single-center study of Lynch syndrome screening in colorectal polyps. **Hered Cancer Clin Pract** 2019; 17:9.

Anexo 1 - Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP.



**A.C. Camargo
Cancer Center**

Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP

*OK
Lamead*

APROVAÇÃO

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antônio Prudente - A.C. Camargo Cancer Center, em sua última reunião de **04/10/2016**, após analisarem a resposta ao questionamento realizado pela CONEP, aprovaram a realização do projeto nº **2192/16** intitulado: **"Sequenciamento de exoma em pacientes com câncer colorretal hereditário negativos para a mutação nos genes de reparo e erros de pareamento"**.

**Pesquisador responsável: Silvia Regina Rogatto,
Aluno: Caroline Moraes Beltrami (Doutorado)**

Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas ao CEP dentro de 06 meses em relatório (modelo CEP).

São Paulo, 11 de outubro de 2016.

Atenciosamente,

Jefferson Luiz Gross
Dr. Jefferson Luiz Gross

1º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

11

Anexo 2 - Laudo de teste genético do indivíduo B15.



Paciente B15 DOB
12.02.1979

Name DOB
12.02.1979

Patient Name	DOB	Sex	MRN	Invitae #
Renata Coudry Benedito Mauro Rossi	12.02.1970	Male		
Clinical Team	Report Date	Sample Type	Sample Collection Date	Sample Accession Date
Renata Coudry Benedito Mauro Rossi	08.11.2017	Blood	07.26.2017	08.01.2017

Test Performed
Sequence analysis and deletion/duplication testing of the 80 genes listed in the results section below.

- Invitae Multi-Cancer Panel

Reason for Testing
Diagnostic test for a personal and family history of disease

Summary

Two Pathogenic variants identified in MUTYH.
Variants of Uncertain Significance identified in PHOX2B and RECQL4.

Clinical Summary

- Two Pathogenic variants, c.1227_1228dupGG (p.Glu410Glyfs*43) and c.536A>G (p.Tyr179Cys), were identified in MUTYH. The data from this test cannot definitively determine if these variants are on the same or opposite chromosomes.
 - The MUTYH gene is associated with autosomal recessive MUTYH-associated polyposis (MAP) (MedGen UID: 332993). Additionally, evidence of varying degrees suggests a possible association between the MUTYH gene and several cancer types (PMID: 19732775, 21171015, 21952991).
 - It is likely that a Pathogenic variant was inherited from each parent and, if so, the presence of two Pathogenic variants in this individual is consistent with a predisposition to, or diagnosis of, MUTYH-associated polyposis (MAP).
 - MAP is characterized by adult-onset multiple colorectal adenomas and increased colorectal cancer (CRC) risk. Lifetime risk for CRC is estimated at 43% to almost 100% in the absence of timely surveillance (PMID: 23035301, 19620482). CRC has been reported in some individuals with homozygous MUTYH variants in the absence of polyposis. Duodenal adenomas are found in 17-25% of individuals with MAP (PMID: 23035301). An increased risk of extraintestinal malignancies such as ovarian, bladder, breast, endometrial, skin and thyroid cancers has also been reported (PMID: 23035301, 19732775, 17956577, 21952991). Clinical management guidelines for MAP can be found at www.nccn.org.
 - Parental testing could determine phase and inform recurrence risk. Please contact Invitae Client Services with any follow-up questions.
- A Variant of Uncertain Significance, c.186G>A (Silent), was identified in PHOX2B.
 - The PHOX2B gene is associated with autosomal dominant congenital central hypoventilation syndrome (CCHS) (MedGen UID: 347052).
 - The clinical significance of this variant is uncertain at this time. Until this uncertainty can be resolved, caution should be exercised before using this result to inform clinical management decisions.
 - This variant is not eligible for complimentary family studies as part of our VUS Resolution Program because the results are unlikely to assist Invitae in reclassifying this particular variant. However, if desired, testing for this variant in other family members can be ordered at a reduced cost through the Family Variant Testing Program. Details on our VUS Resolution and Family Variant Testing Programs can be found at www.invitae.com.
- A Variant of Uncertain Significance, c.134A>T (p.Tyr45Phe), was identified in RECQL4.

- The RECQL4 gene is associated with autosomal recessive Rothmund-Thomson syndrome (MedGen UID: 10819), RAPADILINO syndrome (MedGen UID: 336602), and Baller-Gerold syndrome (MedGen UID: 120532).
- The clinical significance of this variant is uncertain at this time, although because RECQL4-related conditions are autosomal recessive, any single variant is likely insufficient as an explanation for disease. Until this uncertainty can be resolved, caution should be exercised before using this result to inform clinical management decisions.
- This variant is not eligible for complimentary family studies as part of our VUS Resolution Program because the results are unlikely to assist Invitae in reclassifying this particular variant. However, if desired, testing for this variant in other family members can be ordered at a reduced cost through the Family Variant Testing Program. Details on our VUS Resolution and Family Variant Testing Programs can be found at www.invitae.com.
- These results should be interpreted within the context of additional laboratory results, family history, and clinical findings. Genetic counseling is recommended to discuss the implications of this result. For access to a network of genetic providers, please contact Invitae at clientservices@invitae.com, or visit www.nsgc.org or tagc.med.sc.edu/professional_organizations.asp.

Complete Results

Gene	Variant	Zygosity	Variant Classification
MUTYH	c.1227_1228dupGG (p.Glu410Glyfs*43)	heterozygous	PATHOGENIC
MUTYH	c.536A>G (p.Tyr179Cys)	heterozygous	PATHOGENIC
PHOX2B	c.186G>A (Silent)	heterozygous	Uncertain Significance
RECQL4	c.134A>T (p.Tyr45Phe)	heterozygous	Uncertain Significance

The following genes were evaluated for sequence changes and exonic deletions/duplications: ALK, APC, ATM, AXIN2, BAP1, BARD1, BLM, BMPRIA, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CASR, CDC73, CDH1, CDK4, CDKN1B, CDKN1C, CDKN2A (p14ARF), CDKN2A (p16INK4a), CEBPA, CHEK2, DICER1, DIS3L2, EPCAM (Deletion/duplication testing only), FH1, FLCN, GATA2, GPC3, CREM1 (Promoter region deletion/duplication testing only), HRAS, KIT, MAX, MEN1, MET, MLH1, MSH2, MSH6, MUTYH, NBN, NF1, NF2, PALB2, PDGFRA, PHOX2B, PMS2, POLD1, POLE, POT1, PRKARIA, PTCH1, PTEN, RAD50, RAD51C, RAD51D, RB1, RECQL4, RET, RUNX1, SDHAF2, SDHB, SDHC, SDHD, SMAD4, SMARCA4, SMARCB1, SMARCE1, STK11, SUFU, TERC, TERT, TMEM127, TP53, TSC1, TSC2, VHL, WRN, WT1

The following genes were evaluated for sequence changes only: EGFR (c.2369C>T, p.Thr790Met variant only), HOXB13 (c.251G>A, p.Gly84Glu variant only), MTF (c.952G>A, p.Glu318Lys variant only), SDHA

Results are negative unless otherwise indicated

Benign, Likely Benign, and silent and intronic variants with no evidence towards pathogenicity are not included in this report but are available upon request.

Apêndice 1 - Cobertura média e porcentagem das sequências com cobertura de pelo menos 20, 30 e 100 vezes das regiões exônicas obtidas com o sequenciador NextSeq para as amostras dos Grupos 1.

GRUPO 1				
ID	Cobertura Média	20x	30x	100x
A1	437.824	99.7279	99.6404	98.9516
A2	573.299	99.6298	99.461	98.4366
A3	428.721	99.3419	99.0781	96.9623
A4	493.285	99.3873	99.2284	97.2426
A5	386.847	99.1424	98.8439	94.9198
A6	537.3	99.4929	99.2796	97.7698
A7	498.283	99.3392	99.144	97.3783
A8	410.176	99.3423	99.1317	97.0806
A9	459.857	98.8305	98.5091	94.867
A10	475.288	99.4243	99.2055	96.4418
A11	144.663	98.7962	97.9157	77.6627
A12	174.85	98.9358	98.2978	85.4313
A13	221.981	99.3873	99.0249	93.1253
A14	448.629	99.5308	99.2871	98.1586
A15	164.77	99.071	98.2174	83.5962
A16	180.777	99.2619	98.8041	87.2135
A17	179.465	93.5555	84.4992	41.6402
A18	158.3	99.2074	98.3703	70.9475
A19	480.039	99.4156	99.2619	98.3447
A20	178.297	99.2035	98.7836	88.2123
A21	168.35	99.0911	98.452	82.646
A22	433.251	99.4649	99.3041	97.5474
A23	192.358	99.3297	98.9212	88.9816
A24	213.808	99.353	99.1483	90.7524
A25	165.243	99.0308	98.4587	83.994
A26	404.656	99.306	98.9878	95.9974
A27	471.278	99.3238	99.1018	97.0916
A28	499.296	99.349	99.1456	97.2292
A29	244.328	99.2942	99.1329	95.2305

Apêndice 2 - Cobertura média e porcentagem das sequências com cobertura de pelo menos 20, 30 e 100 vezes das regiões exônicas obtidas com o sequenciador NextSeq para as amostras dos Grupos 2.

GRUPO 2									
ID	Cobertura Média (x)	20x	30x	100x	ID	Cobertura Média	20x	30x	100x
B1	166.894	99.3778	98.868	85.5531	B30	465.256	99.2449	99.0225	95.8882
B2	196.665	99.3608	99.1396	91.3305	B31	517.272	99.532	99.3254	97.6693
B3	554.45	99.5765	99.418	98.3289	B32	505.631	99.3036	99.0628	97.109
B4	149.513	99.282	98.6775	80.4122	B33	467.511	98.991	98.6696	96.1907
B5	233.266	99.4279	99.1026	93.3643	B34	490.653	99.4338	99.2658	97.2896
B6	286.658	99.5324	99.4298	97.0679	B35	552.925	99.6566	99.4882	97.995
B7	399.832	99.4389	99.2638	97.6661	B36	398.808	99.4287	99.1385	96.5246
B8	282.507	99.5268	99.3234	96.4926	B37	555.3	99.17	99.0229	97.4639
B9	202.173	99.4626	99.2181	90.8813	B38	582.881	99.5584	99.4046	97.9713
B10	173.61	99.032	98.4689	84.9301	B39	500.658	99.2394	99.0454	97.133
B11	165.905	99.1357	98.6653	84.6029	B40	457.61	99.1554	98.8132	96.0349
B12	430.843	99.319	99.0738	97.4434	B41	468.872	99.2445	98.9874	96.5704
B13	511.413	99.6715	99.5276	98.5785	B42	532.453	99.4835	99.2252	97.8972
B14	167.602	99.1207	98.5277	82.9208	B43	554.369	99.3683	99.1195	97.0904
B15	158.086	99.0486	98.3325	79.1383	B44	464.722	99.5339	99.2307	97.0684
B16	134.693	99.2607	98.5971	76.2839	B45	496.823	99.4649	99.2157	97.2726
B17	129.632	98.7639	97.8234	68.0773	B46	305.591	99.532	99.3841	96.7596
B18	195.128	99.2989	98.6882	78.9293	B47	269.915	99.2958	99.0631	95.5507
B19	207.709	99.3435	99.1124	91.7114					
B20	275.976	99.3695	99.187	96.01					
B21	439.361	99.3703	99.1199	96.2928					
B22	451.279	99.3218	99.146	96.3362					
B23	467.408	99.4448	99.2213	96.9797					
B24	509.859	99.5714	99.3474	97.497					
B25	462.824	99.5367	99.3297	96.4529					
B26	434.785	99.1933	98.9255	96.8751					
B27	417.37	99.3608	99.0663	96.1055					
B28	480.611	99.3226	99.0596	96.251					
B29	459.734	99.3533	99.0695	96.6129					

Apêndice 3 - Variantes germinativas identificadas nos pacientes do Grupo 1.

ID	Gene	Classificação	Região	Tipo de variante	SNP	Troca Base	Troca Aminoácido	dbNFSP	Zigosidade
A1	<i>ATM</i>	Patogênica	<u>11:108160395</u>	Stop gained	.	c.4303A>T	p.Lys1435Ter	2 de 6	Ht
	<i>MSH2</i>	Patogênica	<u>2:47690227</u>	Stop gained	<u>rs587779092</u>	c.1444A>T	p.Arg482Ter	2 de 6	Ht
A2	<i>ABCG2</i>	VUS	<u>4:89018717</u>	Missense	.	c.1535C>G	p.Thr512Ser	2 de 6	Ht
	<i>BRCA2</i>	VUS	<u>13:32936791</u>	Missense	.	c.7937G>A	p.Cys2646Tyr	5 de 6	Ht
	<i>HGF</i>	VUS	<u>7:81399520</u>	Intergênica	<u>rs187388164</u>	.	.	.	Ht
	<i>MLH3</i>	VUS	<u>14:75483787</u>	Stop lost	.	c.4360T>C	p.Ter1454ArgextTer18	0 de 6	Ht
A3	<i>KRAS</i>	VUS	<u>12:25359076</u>	3 prime UTR	.	c.*3653A>G	.	.	Ht
	<i>XRCC2</i>	VUS	<u>7:152346307</u>	Missense	.	c.263A>G	p.Asp88Gly	5 de 6	Ht
A4	<i>APC</i>	VUS	<u>5:112174234</u>	Frameshift	.	c.2942_2943insTA	p.Ser982Thrfs*24	.	Ht
	<i>ATM</i>	VUS	<u>11:108160506</u>	Missense	<u>rs539676759</u>	c.4414T>G	p.Leu1472Val	4 de 6	Ht
A5	<i>BRCA1</i>	VUS	<u>17:41223202</u>	Missense	<u>rs80356909</u>	c.4729T>C	p.Ser1577Pro	2 de 6	Ht
A6	<i>BRCA2</i>	Patogênica	<u>13:32936673</u>	Frameshift	.	c.7819delA	p.Thr2607Leufs*41	.	Ht
A7	<i>EGFR</i>	VUS	<u>7:55211083</u>	Missense	<u>rs145113601</u>	c.326G>C	p.Gly109Ala	6 de 6	Ht
	<i>FLT1</i>	VUS	<u>13:29069276</u>	Intergênica	<u>rs61763163</u>	.	.	.	Ht
	<i>MTHFR</i>	VUS	<u>1:11852412</u>	Missense	<u>rs45496998</u>	c.1555C>T	p.Arg519Cys	4 de 6	Ht
A8	<i>ATM</i>	VUS	11:108225591	Missense	.	c.8840C>A/c.640+31056G>T	p.Thr2947Asn	4 de 6	Ht
	<i>MTHFR</i>	VUS	<u>1:11852412</u>	Missense	<u>rs45496998</u>	c.1555C>T	p.Arg519Cys	4 de 6	Ht

Cont/ Apêndice 3

ID	Gene	Classificação	Região	Tipo de variante	SNP	Troca Base	Troca Aminoácido	dbNFSP	Zigosidade
A9	<i>BRCA1</i>	VUS	<u>17:41246794</u>	Missense	<u>rs273902786</u>	c.754C>T	p.Arg252Cys	4 de 6	Ht
	<i>BRIP1</i>	VUS	<u>17:59926582</u>	Missense	<u>rs202072866</u>	c.415T>G	p.Ser139Ala	3 de 6	Ht
	<i>CHEK2</i>	VUS	<u>22:29095872</u>	Missense	<u>rs374395284</u>	c.962A>C	p.Glu321Ala	5 de 6	Ht
	<i>EGFR</i>	VUS	<u>7:55270292</u>	Missense	.	c.3245T>G	p.Ile1082Arg	1 de 6	Ht
	<i>IGF1R</i>	VUS	<u>15:99500763</u>	3 prime UTR	.	c.*95_*97delCCT	.	.	Ht
	<i>MSH2</i>	Patogênica	<u>2:47702372</u>	Stop gained	<u>rs63751317</u>	c.1968C>G	p.Tyr656Ter	2 de 6	Ht
A10	<i>APC</i>	VUS	<u>5:112073598</u>	5 prime UTR	.	c.-43A>C	.	.	Ht
	<i>FGF1</i>	VUS	<u>5:141993722</u>	5 prime UTR	<u>rs373156800</u>	c.-30G>A	.	.	Ht
	<i>GALNT12</i>	VUS	<u>9:101611292</u>	Missense	<u>rs761631783</u>	c.1664C>T	p.Ser555Leu	0 de 6	Ht
	<i>JAK1</i>	VUS	<u>1:65321324</u>	Missense	<u>rs61735631</u>	c.1516C>T	p.Arg506Cys	1 de 6	Ht
	<i>PTEN</i>	VUS	<u>10:89720731</u>	Missense	<u>rs143335584</u>	c.882T>G	p.Ser294Arg	3 de 6	Ht
A11	<i>EGFR</i>	VUS	<u>7:55221825</u>	Missense	.	c.869C>T	p.Thr290Ile	3 de 6	Ht
	<i>FLT4</i>	VUS	<u>5:180038461</u>	Missense	<u>rs762445498</u>	c.3556A>G	p.Met1186Val	0 de 6	Ht
	<i>PTEN</i>	VUS	<u>10:89727452</u>	3 prime UTR	<u>rs745975387</u>	c.*2223G>T	.	.	Ht
A12	<i>EPCAM</i>	VUS	<u>2:47601029</u>	Missense	<u>rs146480420</u>	c.267G>C	p.Gln89His	4 de 6	Ht
A13	<i>STK11</i>	VUS	<u>19:1228315</u>	3 prime UTR	.	c.*740A>G	.	.	Ht

Cont/ Apêndice 3

ID	Gene	Classificação	Região	Tipo de variante	SNP	Troca Base	Troca Aminoácido	dbNFSP	Zigosidade
A14	<i>FLT3</i>	VUS	<u>13:28609751</u>	Missense	<u>rs141942072</u>	c.1478G>A	p.Gly493Glu	4 de 6	Ht
	<i>GNAQ</i>	VUS	<u>9:80336116</u>	3 prime UTR	.	c.*123G>A	.	.	Ht
	<i>JAK1</i>	VUS	<u>1:65306993</u>	Missense	<u>rs371295663</u>	c.2584G>A	p.Ala862Thr	0 de 6	Ht
	<i>JUN</i>	VUS	<u>1:59248085</u>	Missense	<u>rs377289876</u>	c.658C>G	p.Pro220Ala	5 de 6	Ht
	<i>KIT</i>	VUS	<u>4:55606760</u>	3 prime UTR	.	c.*2037G>A	.	.	Ht
	<i>MSH2</i>	VUS	<u>2:47710068</u>	Stop gained	<u>rs551060742</u>	c.2785C>T	p.Arg929Ter	2 de 6	Ht
	<i>NOTCH1</i>	Likely-Patogênica	<u>9:139405141</u>	Missense	.	c.2704C>T	p.Arg902Cys	5 de 6	Ht
A15	<i>APC</i>	VUS	<u>5:112073598</u>	5 prime UTR	.	c.-43A>C	.	.	Ht
	<i>CCND1</i>	VUS	<u>11:69465941</u>	Missense	<u>rs779733976</u>	c.779G>A	p.Arg260His	5 de 6	Ht
	<i>FGFR1</i>	VUS	<u>8:38285476</u>	Missense	<u>rs770139002</u>	c.584A>G	p.Lys195Arg	2 de 6	Ht
	<i>MTHFR</i>	VUS	<u>1:11849417</u>	Missense	.	c.4264A>G/ c.*1320T>C	p.Lys1422Glu,	0 de 6	Ht
A16	<i>NOTCH1</i>	VUS	<u>9:139417590</u>	Missense	<u>rs750242131</u>	c.454G>A	p.Gly152Ser	6 de 6	Ht
A19	<i>AR</i>	VUS	<u>X:66946904</u>	3 prime UTR	<u>rs182880285</u>	c.*3221A>C	.	.	Ht
	<i>KDM4C</i>	VUS	<u>9:6805732</u>	Missense	<u>rs765137791</u>	c.278C>G	p.Ala93Gly	2 de 6	Ht
	<i>MSH2</i>	Likely-Patogênica	<u>2:47637384</u>	Missense	<u>rs63750070</u>	c.518T>G	p.Leu173Arg	6 de 6	Ht
	<i>POLE</i>	VUS	<u>12:133226046</u>	Missense	<u>rs149462407</u>	c.3851G>A	p.Arg1284Gln	1 de 6	Ht
	<i>VEGFA</i>	VUS	<u>6:43748538</u>	Sinônima	<u>rs777846438</u>	c.1032C>T	p.Ser344=	.	Ht
A20	<i>RAD51B</i>	VUS	<u>14:69149657</u>	Missense	<u>rs532374150</u>	c.1040A>G	p.Gln347Arg	.	Ht
A21	<i>RET</i>	VUS	<u>10:43609990</u>	Missense	<u>rs77711105</u>	c.1942G>A	p.Val648Ile	2 de 6	Ht

Cont/ Apêndice 3

ID	Gene	Classificação	Região	Tipo de variante	SNP	Troca Base	Troca Aminoácido	dbNFSP	Zigosidade
A22	<i>AR</i>	VUS	X:66765796	Missense	rs773305418	c.808G>C	p.Ala270Pro	6 de 6	Hm
	<i>EZH2</i>	VUS	7:148523610	Sinônima	.	c.843T>C	p.Phe281=	.	Ht
	<i>MSH2</i>	Patogênica	2:47703652	Stop gained	rs587779139	c.2152C>T	p.Gln718Ter	2 de 6	Ht
	<i>POLD1</i>	VUS	19:50919923	Missense	rs767795037	c.3010G>A	p.Ala1004Thr	3 de 6	Ht
A23	<i>RET</i>	VUS	10:43624328	3 prime UTR	.	c.*611C>A	.	.	Ht
A24	<i>EPCAM</i>	VUS	2:47604198	Missense	.	c.537A>T	p.Lys179Asn	4 de 6	Ht
	<i>ERBB3</i>	VUS	12:56480392	Missense	.	c.499G>A	p.Val167Met	4 de 6	Ht
A26	<i>BRCA2</i>	VUS	13:32953641	Missense	rs398122716	c.8942A>G	p.Glu2981Gly	2 de 6	Ht
	<i>BRIP1</i>	VUS	17:59926582	Missense	rs202072866	c.415T>G	p.Ser139Ala	3 de 6	Ht
	<i>POLE</i>	VUS	12:133219838	Missense	rs142508245	c.4523G>A	p.Arg1508His	2 de 6	Ht
A27	<i>ATM</i>	VUS	11:108121787	Missense	rs35963548	c.1595G>A	p.Cys532Tyr	5 de 6	Ht
	<i>FLT4</i>	VUS	5:180047996	Missense	.	c.2179G>A	p.Ala727Thr	2 de 6	Ht
A28	<i>ALK</i>	VUS	2:29917796	Missense	rs572340007	c.872G>A	p.Arg291His	3 de 6	Ht
	<i>ATM</i>	VUS	11:108122625	Missense	.	c.1669A>G	p.Met557Val	0 de 6	Ht
	<i>KDM4C</i>	VUS	9:6990438	Missense	rs771391567	c.1700C>T	p.Thr567Ile	2 de 6	Ht
	<i>PTEN</i>	VUS	10:89725995	3 prime UTR	.	c.*766G>A	.	.	Ht
A29	<i>FLT3</i>	VUS	13:28602329	Missense	rs372303125	c.2039C>T	p.Ala680Val	5 de 6	Ht

Apêndice 4 - Variantes germinativas identificadas nos pacientes do Grupo 2.

ID	Gene	Classificação	Região	Tipo de variante	SNP	Troca Base	Troca Aminoácido	dbNFSP	Zigosidade
B1	<i>APC</i>	VUS	<u>5:112177911</u>	Missense	<u>rs758337476</u>	c.6620C>T	p.Ser2207Leu	4 de 6	Ht
	<i>FGF1</i>	VUS	<u>5:142023866</u>	5 prime UTR	<u>rs182273775</u>	c.-34-30140T>G	.	.	Ht
B2	<i>ERBB3</i>	VUS	<u>12:56478852</u>	Missense	<u>rs778104039</u>	c.308G>A	p.Arg103His	6 de 6	Ht
	<i>IGF1R</i>	VUS	<u>15:99507647</u>	3 prime UTR	<u>rs367849737</u>	c.*6977_*6978delGA	.	.	Ht
	<i>POLE</i>	VUS	<u>12:133256230</u>	Missense	<u>rs755709875</u>	c.431A>G	p.His144Arg	5 de 6	Ht
B3	<i>ABCC1</i>	VUS	<u>16:16196490</u>	Missense	<u>rs751066573</u>	c.2651C>T	p.Thr884Met	2 de 6	Ht
	<i>DNMT3A</i>	VUS	<u>2:25470908</u>	Missense	<u>rs201882909</u>	c.853G>A	p.Glu285Lys	2 de 6	Ht
	<i>FLT3</i>	VUS	<u>13:28644747</u>	Missense	<u>rs62636526</u>	c.46G>C	p.Val16Leu	3 de 6	Ht
B4	<i>EGFR</i>	VUS	<u>7:55268045</u>	Missense	<u>rs144496976</u>	c.2885G>A	p.Arg962His	5 de 6	Ht
	<i>NOTCH1</i>	VUS	<u>9:139396835</u>	Missense	<u>rs373841359</u>	c.5273G>A	p.Arg1758His	5 de 6	Ht
B5	<i>MTHFR</i>	Likely-Patogênica	<u>1:11862941</u>	Stop gained	.	c.233C>G	p.Ser78Ter	2 de 6	Ht
B7	<i>FLT1</i>	VUS	<u>13:28964202</u>	Missense	<u>rs374335323</u>	c.1700C>T	p.Pro567Leu	5 de 6	Ht
	<i>IDH1</i>	VUS	<u>2:209113206</u>	Missense	<u>rs762588599</u>	c.301A>T	p.Asn101Tyr	5 de 6	Ht
	<i>MTHFR</i>	Likely-Patogênica	<u>1:11862941</u>	Stop gained	.	c.233C>G	p.Ser78Ter	2 de 6	Ht
B8	<i>MUTYH</i>	Likely-Patogênica	<u>1:45797228</u>	Missense	<u>rs36053993</u>	c.1187G>A	p.Gly396Asp	6 de 6	Ht
	<i>RBI</i>	VUS	<u>13:48954365</u>	Missense	.	c.1486G>T	p.Ala496Ser	5 de 6	Ht
B9	<i>ERBB4</i>	VUS	<u>2:213403353</u>	Intergênica	<u>rs142531677</u>	.	.	.	Ht
	<i>MLH3</i>	VUS	<u>14:75513436</u>	Missense	.	c.2923A>G	p.Asn975Asp	1 de 6	Ht
	<i>RAD50</i>	VUS	<u>5:131953850</u>	Missense	<u>rs143189763</u>	c.3253A>G	p.Ile1085Val	3 de 6	Ht

Cont/ Apêndice 4

ID	Gene	Classificação	Região	Tipo de variante	SNP	Troca Base	Troca Aminoácido	dbNFSP	Zigosidade
B11	<i>FGF1</i>	VUS	<u>5:141993722</u>	5 prime UTR	<u>rs373156800</u>	c.-30G>A	.	.	Ht
	<i>NOTCH1</i>	VUS	<u>9:139405221</u>	Missense	.	c.2624T>C	p.Leu875Pro	3 de 6	Ht
	<i>RAD50</i>	VUS	<u>5:131925474</u>	Missense	<u>rs752489625</u>	c.1397A>C	p.Gln466Pro	3 de 6	Ht
B13	<i>MSH6</i>	Patogênica	<u>2:48028135</u>	Stop gained	<u>rs63750563</u>	c.3013C>T	p.Arg1005Ter	2 de 6	Ht
	<i>VEGFA</i>	VUS	<u>6:43754178</u>	3 prime UTR	.	c.*1879A>C	.	.	Ht
B14	<i>ARF1</i>	VUS	<u>1:228286563</u>	3 prime UTR	.	c.*849A>G	.	.	Ht
	<i>ATM</i>	Likely-Patogênica	<u>11:108205807</u>	Missense	<u>rs587782719</u>	c.8122G>A/ c.641-26009C>T	p.Asp2708Asn	5 de 6	Ht
B15	<i>ATM</i>	VUS	<u>11:108119823</u>	Missense	<u>rs56128736</u>	c.1229T>C	p.Val410Ala	4 de 6	Ht
	<i>FLT1</i>	VUS	<u>13:29005390</u>	Missense	.	c.871A>G	p.Ile291Val	0 de 6	Ht
	<i>MUTYH</i>	VUS	<u>1:45797187</u>	Frameshift	<u>rs587780078</u>	c.1227_1228dupGG	p.Glu410Glyfs*43	.	Ht
	<i>MUTYH</i>	Likely-Patogênica	<u>1:45798475</u>	Missense	<u>rs34612342</u>	c.536A>G	p.Tyr179Cys	6 de 6	Ht
B17	<i>ATM</i>	VUS	<u>11:108224555</u>	Missense	<u>rs376676328</u>	c.8734A>G/ c.640+32092T>C	p.Arg2912Gly	6 de 6	Ht
	<i>RAD51C</i>	VUS	<u>17:56774141</u>	Missense	<u>rs573992101</u>	c.492T>G	p.Phe164Leu	4 de 6	Ht
B19	<i>CTNNB1</i>	VUS	<u>3:41281900</u>	3 prime UTR	.	c.*1072dupA	.	.	Ht
	<i>MUS81</i>	VUS	<u>11:65633325</u>	Missense	<u>rs774184394</u>	c.1549G>A	p.Glu517Lys	5 de 6	Ht
	<i>NOTCH1</i>	VUS	<u>9:139393351</u>	Sinônima	.	c.6180G>A	p.Arg2060=	.	Ht

Cont/ Apêndice 4

ID	Gene	Classificação	Região	Tipo de variante	SNP	Troca Base	Troca Aminoácido	dbNFSP	Zigosidade
B20	<i>MSH6</i>	VUS	<u>2:48026141</u>	Missense	<u>rs61753793</u>	c.1019T>C	p.Phe340Ser	5 de 6	Ht
	<i>NF1</i>	VUS	<u>17:29704362</u>	3 prime UTR	<u>rs548353495</u>	c.*3189G>A	.	.	Ht
	<i>STK11</i>	VUS	<u>19:1223101</u>	Sinônima	<u>rs767565606</u>	c.1038C>T	p.Gly346=	.	Ht
	<i>TYMS</i>	VUS	<u>18:657686</u>	5 prime UTR	.	c.-42_-15del GCCGCGCCACT TCGCCTGCCT CCGTCCC/ c.*34+129_*34+ 156delGAAGTGGCG CGGCGGGACGGAG GCAGGC	.	.	Ht
B21	<i>ATM</i>	VUS	<u>11:108224555</u>	Missense	<u>rs376676328</u>	c.8734A>G/ c.640+32092T>C	p.Arg2912Gly	6 de 6	Ht
	<i>HSPH1</i>	VUS	<u>13:31736159</u>	Inframe deletion	.	c.71_73delAAG	p.Glu24del	.	Ht
B22	<i>BMPRIA</i>	VUS	<u>10:88679051</u>	Missense	.	c.991C>G	p.Leu331Val	4 de 6	Ht
	<i>SCG5</i>	VUS	<u>15:32972075</u>	Missense	<u>rs754073241</u>	c.335G>A	p.Gly112Glu	4 de 6	Ht
B23	<i>APC</i>	VUS	<u>5:112175825</u>	Missense	<u>rs778699501</u>	c.4534G>A	p.Asp1512Asn	5 de 6	Ht
	<i>HGF</i>	VUS	<u>7:81328496</u>	3 prime UTR	.	c.*3401T>C	.	.	Ht
B24	<i>BRCA2</i>	VUS	<u>13:32911295</u>	Missense	<u>rs28897716</u>	c.2803G>C	p.Asp935His	0 de 6	Ht
B25	<i>NF1</i>	VUS	<u>17:29549713</u>	3 prime UTR	<u>rs563448695</u>	c.1722-749A>G	.	.	Ht
	<i>RET</i>	VUS	<u>10:43596003</u>	Missense	<u>rs779915615</u>	c.170G>A	p.Arg57Gln	0 de 6	Ht
B27	<i>ATM</i>	VUS	<u>11:108139302</u>	Missense	<u>rs3218708</u>	c.2804C>G	p.Thr935Arg	0 de 6	Ht
	<i>GNAQ</i>	VUS	<u>9:80336149</u>	3 prime UTR	.	c.*90A>G	.	.	Ht

Cont/ Apêndice 4

ID	Gene	Classificação	Região	Tipo de variante	SNP	Troca Base	Troca Aminoácido	dbNFSP	Zigosidade
B28	<i>BRCA2</i>	VUS	<u>13:32930688</u>	Missense	<u>rs80358982</u>	c.7559G>A	p.Arg2520Gln	6 de 6	Ht
	<i>GREM1</i>	VUS	<u>15:33023086</u>	Sinônima	<u>rs754459001</u>	c.195C>T	p.Gly65=	.	Ht
	<i>HSPH1</i>	VUS	<u>13:31712670</u>	Missense	.	c.2250G>A	p.Met750Ile	2 de 6	Ht
B29	<i>POLD1</i>	VUS	<u>19:50905071</u>	Missense	<u>rs780604625</u>	c.353C>T	p.Ser118Phe	0 de 6	Ht
B30	<i>MLH1</i>	Patogênica	<u>3:37061926</u>	Frameshift	<u>rs63750853</u>	c.1011delC	p.Asn338Ilefs*29	.	Ht
	<i>MUS81</i>	VUS	<u>11:65630625</u>	Missense	<u>rs765478661</u>	c.695A>G	p.Lys232Arg	0 de 6	Ht
B31	<i>APC</i>	VUS	<u>5:112176527</u>	Missense	.	c.5236A>G	p.Ile1746Val	3 de 6	Ht
B32	<i>EGFR</i>	VUS	<u>7:55211083</u>	Missense	<u>rs145113601</u>	c.326G>C	p.Gly109Ala	6 de 6	Ht
	<i>FLT1</i>	VUS	<u>13:29069276</u>	Intergênica	<u>rs61763163</u>	.	.	.	Ht
	<i>MTHFR</i>	VUS	<u>1:11852412</u>	Missense	<u>rs45496998</u>	c.1555C>T	p.Arg519Cys	4 de 6	Ht
B33	<i>KDM4C</i>	VUS	<u>9:6986353</u>	Missense	.	c.1364G>A	p.Cys455Tyr	0 de 6	Ht
	<i>KRAS</i>	VUS	<u>12:25358257</u>	3 prime UTR	.	c.*4468_*4472del AGTGA	.	.	Ht
	<i>RAD51B</i>	VUS	<u>14:69149657</u>	Missense	<u>rs532374150</u>	c.1040A>G	p.Gln347Arg	.	Ht
B34	<i>KRAS</i>	VUS	<u>12:25368390</u>	Frameshift	.	c.451-5545dupA	.	.	Ht
	<i>MSH6</i>	VUS	<u>2:48010445</u>	Missense	<u>rs267608026</u>	c.73G>T	p.Ala25Ser	1 de 6	Ht
	<i>RAD50</i>	VUS	<u>5:131953850</u>	Missense	<u>rs143189763</u>	c.3253A>G	p.Ile1085Val	3 de 6	Ht
B35	<i>ALK</i>	VUS	<u>2:29754808</u>	Missense	.	c.1127T>C	p.Leu376Pro	2 de 6	Ht
	<i>MTOR</i>	VUS	<u>1:11186770</u>	Sinônima	.	c.6435C>T	p.Asp2145=	.	Ht
B36	<i>APC</i>	VUS	<u>5:112174471</u>	Frameshift	<u>rs587779352</u>	c.3183_3187delACAAA	p.Gln1062Ter	.	Ht
	<i>ATM</i>	VUS	<u>11:108143535</u>	Missense	<u>rs149911447</u>	c.3240C>A	p.Asp1080Glu	4 de 6	Ht
B37	<i>POLD1</i>	VUS	<u>19:50905322</u>	Missense	<u>rs3218750</u>	c.530G>A	p.Arg177His	3 de 6	Ht
	<i>VEGFA</i>	VUS	<u>6:43742118</u>	Missense	<u>rs138919899</u>	c.647A>T	p.Asn216Ile	2 de 6	Ht

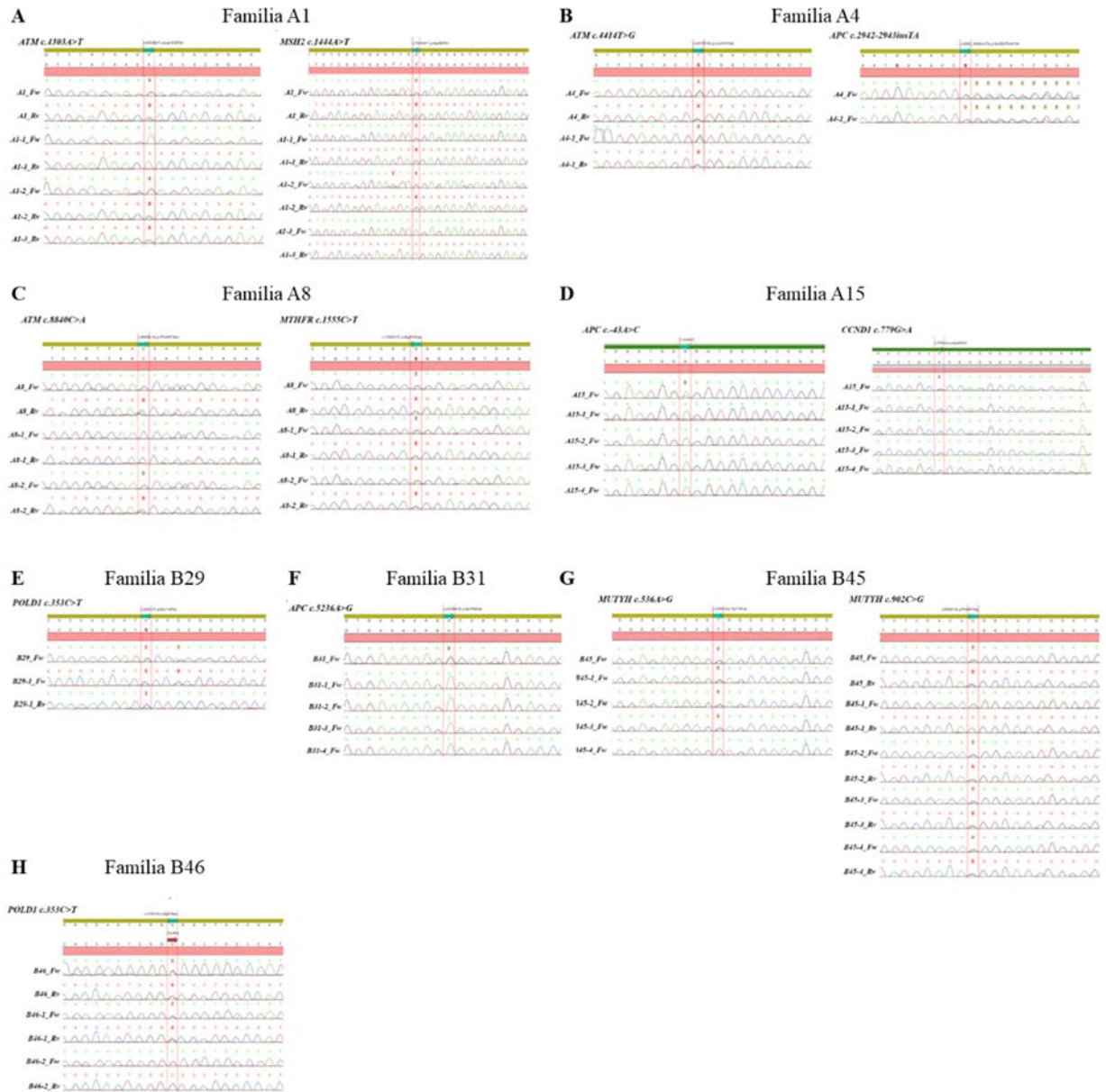
Cont/ Apêndice 4

ID	Gene	Classificação	Região	Tipo de variante	SNP	Troca Base	Troca Aminoácido	dbNFSP	Zigosidade
B38	<i>ALK</i>	VUS	<u>2:29416695</u>	Missense	.	c.4258G>A	p.Gly1420Arg	1 de 6	Ht
	<i>BARD1</i>	VUS	<u>2:215645330</u>	Missense	<u>rs749383704</u>	c.1268A>G	p.Lys423Arg	3 de 6	Ht
	<i>CHEK2</i>	VUS	<u>22:29092948</u>	Missense	<u>rs201206424</u>	c.1036C>T	p.Arg346Cys	5 de 6	Ht
	<i>CTNNB1</i>	VUS	<u>3:41266972</u>	Missense	<u>rs369771822</u>	c.643G>A	p.Ala215Thr	2 de 6	Ht
	<i>DNMT3B</i>	VUS	<u>20:31383232</u>	Missense	<u>rs35846833</u>	c.1144C>T	p.Arg382Cys	5 de 6	Ht
B39	<i>ATM</i>	VUS	<u>11:108141988</u>	Missense	<u>rs139552233</u>	c.2932T>C	p.Ser978Pro	5 de 6	Ht
	<i>ERBB2</i>	VUS	<u>17:37871770</u>	Missense	<u>rs367606199</u>	c.1294C>T	p.Arg432Trp	6 de 6	Ht
	<i>NF1</i>	VUS	<u>17:29677249</u>	Frameshift	.	c.7308_7309delTA	p.His2436Glnfs*8	.	Ht
	<i>XRCC2</i>	VUS	<u>7:152345950</u>	Missense	<u>rs61762969</u>	c.620A>G	p.Glu207Gly	1 de 6	Ht
B40	<i>ATM</i>	VUS	<u>11:108224555</u>	Missense	<u>rs376676328</u>	c.8734A>G/ c.640+32092T>C	p.Arg2912Gly	6 de 6	Ht
	<i>HSPH1</i>	VUS	<u>13:31736159</u>	Inframe deletion	.	c.71_73delAAG	p.Glu24del	.	Ht
B41	<i>BRCA2</i>	VUS	<u>13:32914809</u>	Missense	<u>rs56172926</u>	c.6317T>C	p.Leu2106Pro	0 de 6	Ht
	<i>RET</i>	VUS	<u>10:43607666</u>	Missense	<u>rs374461212</u>	c.1642G>A	p.Gly548Ser	4 de 6	Ht
B42	<i>MSH6</i>	VUS	<u>2:48027299</u>	Missense	<u>rs574358605</u>	c.2177T>A	p.Phe726Tyr	4 de 6	Ht
	<i>MUS81</i>	VUS	<u>11:65629482</u>	Missense	<u>rs148465534</u>	c.416G>A	p.Arg139Gln	1 de 6	Ht
B43	<i>NF1</i>	VUS	<u>17:29552239</u>	Missense	<u>rs763901597</u>	c.1972C>T	p.Leu658Phe	3 de 6	Ht
B44	<i>DNMT3B</i>	VUS	<u>20:31383232</u>	Missense	<u>rs35846833</u>	c.1144C>T	p.Arg382Cys	5 de 6	Ht
	<i>JUN</i>	VUS	<u>1:59249749</u>	5 prime UTR	.	c.-1007A>C	.	.	Ht
	<i>NOTCH1</i>	VUS	<u>9:139407871</u>	Missense	<u>rs377286829</u>	c.2326G>A	p.Val776Met	4 de 6	Ht

Cont/ Apêndice 4

ID	Gene	Classificação	Região	Tipo de variante	SNP	Troca Base	Troca Aminoácido	dbNFSP	Zigosidade
B45	<i>MUTYH</i>	Likely-Patogênica	<u>1:45798475</u>	Missense	<u>rs34612342</u>	c.536A>G	p.Tyr179Cys	6 de 6	Ht
	<i>MUTYH</i>	VUS	<u>1:45797869</u>	Missense	.	c.902C>G	p.Pro301Arg	6 de 6	Ht
	<i>RAD51B</i>	VUS	<u>14:68353784</u>	Missense	<u>rs28908168</u>	c.619G>T	p.Val207Leu	2 de 6	Ht
B46	<i>CDKN2A</i>	VUS	<u>9:21971188</u>	Missense	<u>rs372266620</u>	c.170C>A	p.Ala57Asp	1 de 6	Ht
	<i>PMS2</i>	VUS	<u>7:6018238</u>	Missense	<u>rs386833410</u>	c.2264T>C	p.Ile755Thr	5 de 6	Ht
B47	<i>MLH3</i>	VUS	<u>14:75513222</u>	Missense	<u>rs201303087</u>	c.3137G>A	p.Arg1046Gln	1 de 6	Ht
	<i>RAD51B</i>	VUS	<u>14:69149657</u>	Missense	<u>rs532374150</u>	c.1040A>G	p.Gln347Arg	.	Ht
	<i>RB1</i>	VUS	<u>13:48937017</u>	Missense	<u>rs752342013</u>	c.785G>A	p.Arg262Gln	3 de 6	Ht
	<i>VEGFA</i>	VUS	<u>6:43752596</u>	3 prime UTR	<u>rs551692177</u>	c.*297G>A	.	.	Ht

Apêndice 5 - Eletroferogramas representando as variantes avaliadas em cada família.



Legenda: (A) Eletroferogramas representando as variantes c.4303A>T em *ATM* e c.1444A>T em *MSH2* identificadas no paciente A1. O sequenciamento do indivíduo A1-1 revelou homozigose para o alelo selvagem (AA) e o sequenciamento dos indivíduos A1-2, A1-3 e A1 (probando) mostrou heterozigose para o alelo alterado (AT) em *ATM*. O sequenciamento do indivíduo A1-3 revelou homozigose para o alelo selvagem (AA). O sequenciamento dos indivíduos A1-1, A1-2 e A1 (probando) mostrou heterozigose para o alelo alterado (AT) em *MSH2*. A faixa em verde representa a sequência de referência e a seta verde a posição da base onde ocorreu a troca de A pela base T no probando. (B) Eletroferogramas representando a variante c.2942_2943insTA em *APC* e a variante c.4414T>G em *ATM* identificadas no paciente A4. O sequenciamento do indivíduo A4-1 e do probando (A4) revelou

heterozigose para a inserção de TA, alterando o quadro de leitura da sequência em *APC* e o sequenciamento do indivíduo A4-1 e do probando (A4) revelou heterozigose para o alelo alterado (TG) em *ATM*. A faixa em verde representa a sequência de referência e a seta verde a posição da base onde ocorreu a inserção TA em *APC* e troca da base T pela base G em *ATM* no probando. **(C)** Eletroferogramas representando as variantes nos genes *ATM* c.8840C>A e *MTHFR* c.1555C>T identificadas no paciente A8. O sequenciamento dos indivíduos A8-1, A8-2 e do probando (A8) revelou heterozigose para o alelo alterado (CA) em *ATM* e o sequenciamento dos indivíduos A8-1, A8-2 e do probando (A8) revelou heterozigose para o alelo alterado (GA – *minus strand*) em *MTHFR*. A faixa em verde representa a sequência de referência e a seta verde a posição da base onde ocorreu a troca da base C pela base A em *ATM* e a troca da base C pela base T em *MTHFR* no probando. **(D)** Eletroferogramas representando a variante c.-43A>C em *APC* e a variante c.779G>A em *CCND1* identificadas no paciente A15. O sequenciamento dos indivíduos A15-1, A15-2, A15-3 e A15-4 revelou homozigose para o alelo selvagem (AA) em *APC* e confirmou a alteração no probando (A15). O sequenciamento dos indivíduos A15-1, A15-2, A15-3 e A15-4 revelou homozigose para o alelo selvagem (GG) em *CCND1* e confirmou a alteração no probando. A faixa em verde representa a sequência de referência e a seta verde a posição da base onde ocorreu a troca da base A pela base C em *APC* e a troca da base G pela base A *CCND1* no probando. **(E)** Eletroferogramas representando a variante c.353C>T em *POLD1* identificada no paciente B29. O sequenciamento dos indivíduos B29-1 e B29 (probando) revelou heterozigose para o alelo alterado (CT) em *POLD1*. A faixa em verde representa a sequência de referência e a seta verde a posição da base onde ocorreu a troca da base C pela base T em *POLD1* no probando. **(F)** Eletroferogramas representando a variante c.5236A>G em *APC* identificada no paciente B31. O sequenciamento dos indivíduos B31-1, B31-2, B31-3 e B31-4 revelou homozigose para o alelo selvagem (AA) em *APC* e o sequenciamento do indivíduo B31 (probando) confirmou heterozigose para o alelo alterado (AG). A faixa em verde representa a sequência de referência e a seta verde a posição da base onde ocorreu a troca da base A pela base G em *APC* no probando. **(G)** Eletroferogramas representando as variantes c.902C>G e c.536A>G em *MUTYH* identificada no paciente B45. O sequenciamento de B45-1 revelou homozigose para o alelo selvagem (GG) para a variante c.902C>G e o sequenciamento dos indivíduos B45 (probando), B45-2 e B45-3 confirmou heterozigose para o alelo alterado (CG). O sequenciamento dos indivíduos B45 (probando), B45-1, B45-2 e B45-3 confirmou heterozigose para o alelo alterado (TC) referente a variante c.536A>G em *MUTYH*. A faixa em verde representa a sequência de referência e a seta verde a posição da base onde ocorreu a troca da base A pela base G em *MUTYH* no probando. **(H)** Eletroferogramas representando as variantes c.2264T>C em *PMS2* e c.170C>A em *CDKN2A* identificadas no paciente B46. O sequenciamento de B46 (probando) revelou heterozigose para o alelo alterado (AG) apenas no pseudogene de *PMS2*. O sequenciamento de B46-2 revelou homozigose para o alelo selvagem (GG) em *CDKN2A* e o sequenciamento dos indivíduos B46 (probando), B46-1, confirmou heterozigose para o alelo alterado (GT). A faixa em verde representa a sequência de referência e a seta verde a posição da base onde ocorreu a troca da base A pela base G em *CDKN2A* no probando. Crom: cromossomo; A: verde; T: vermelho; G: preto; C: azul.