

**ALTERAÇÕES GENÔMICAS EM PACIENTES
PORTADORES DE MÚLTIPLOS TUMORES
PRIMÁRIOS NEGATIVOS PARA MUTAÇÕES NO
GENE *TP53***

TATIANE RAMOS BASSO

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio
Prudente para a obtenção do Título de Mestre em
Ciências**

Área de concentração: Oncologia

Orientadora: Profa. Dra. Silvia Regina Rogatto

Co-Orientadora: Dra. Maria Isabel Achatz

São Paulo

2014

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Basso, Tatiane Ramos

Alterações genômicas em pacientes portadores de múltiplos tumores primários negativos para mutações no gene *TP53* / Tatiane Ramos Basso – São Paulo, 2014.

151p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientadora: Silvia Regina Rogatto.

Descritores: 1. SÍNDROMES NEOPLÁSICAS HEREDITÁRIAS. 2. GENE P53. 3. GENES SUPRESSORES. 4. POLIMORFISMO DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO. 5. SÍNDROME DE TURNER. 6. VARIAÇÕES DO NÚMERO DE CÓPIAS DE DNA. 7. CARIÓTIPO.

“Que aproveita ao homem ganhar o mundo inteiro e perder a sua alma?”

Marcos 8:36

*"O que somos é o presente de Deus a nós.
O que nos tornamos é nosso presente a Deus."*

Eleanor Powell

DEDICATÓRIA

Eu dedico primeiramente para o meu **Deus**, com a permissão dele hoje eu posso subir mais esse degrau na minha vida. Por sempre me dar sabedoria, força, coragem e muita fé para seguir em frente e conquistar todos os meus sonhos. Tudo na minha vida é com a graça de Deus.

Para minha Avó **Maria Aparecida** que por vontade de Deus já não está mais presente ao nosso meio, mas que teve o papel principal na minha vida e na minha formação. Por todo o seu carinho e dedicação, me fazendo acreditar que eu posso conquistar os meus sonhos, que o mundo pode ser conquistado basta a gente acreditar em Deus e lutar com todas as nossas forças. Que deixou saudades eternas e exemplos de vida que vou levar para todo o sempre. Serei eternamente grata minha “Vózinha do coração” e sei que nesse dia especial para mim, ela ganha ainda mais paz porque também era um dos seus sonhos.

Para a minha Mãe **Ione**, que é a minha melhor amiga, minha companheira de todas as horas, por sempre estar do meu lado, por me dar forças, por sempre ter a sabedoria em suas palavras, por todas suas orações me encorajando a seguir em frente mesmo nos momentos mais difíceis. Obrigada por tudo Mãe, você é a minha vida, eu te amo.

Para meu Irmão **Raphael**, que é um filho para mim, por alegrar todos os meus dias com esse seu jeito feliz e confiante em Deus, por me ensinar a passar por cada obstáculo da vida sorrindo, por sempre segurar nas minhas mãos e me fazer se sentir a Irmã mais amada desse mundo. Te amo, você é o meu presente de Deus.

Para o meu Pai **Luis Alberto** que mesmo longe se faz presente na minha vida, por sempre que possível nos faz esquecer de tudo com suas festas mais animadas rs, e por além de Pai ser meu amigo. Te amo Pai.

E por último para ao meu namorado **Leandro**, por ser esse anjo de Deus na minha vida, por me compreender em todos os momentos, por ter o dom de me fazer sorrir em todas as situações, por todo esse amor e cuidado comigo e por se fazer presente na minha vida mesmo estando muito distante. Te amo.

AGRADECIMENTOS

Eu agradeço a minha Orientadora Dra^a **Silvia R Rogatto**, por além de Orientadora ser Mãe, amiga e companheira. Por toda a sua dedicação e paciência em todos os momentos, por todas as oportunidades que nos proporciona sempre pensando no crescimento de todo o grupo. Por todos os puxões de orelha que nos fazem abrir os olhos e focar nos nossos objetivos. Por ser esse exemplo de pessoa e profissional mantendo sua humildade acima de tudo. Sem ela isso não estaria acontecendo. Eu agradeço a Deus por tê-la na minha vida. Muito obrigada.

Eu agradeço aos meus Irmãos (as), **César, Vanessa, Raphael e Isabelly**, por sempre estarem do meu lado independente da distância e situação. Por além de irmãos (as) serem meus melhores amigos. Eu amo vocês.

Eu agradeço a minha família, minha Avó **Vilma**, meu Tio **Osvaldo, Andréia**, minha Tia **Sandra, Cristiano, Geovanna, Gabriel, Lorena, Sueli**, minha Bisavó **Claudemira**, minha Tia **Nair**, entre outros, por sempre estarem presentes nas minhas conquistas ao longo de toda a minha caminhada. Obrigada por todo o carinho. Isso tudo também é por vocês.

Agradeço aos meus amigos de Escola, Faculdade, dia-a-dia (**Ana Tiéli, Caroline Servilha, Carol Danello, Vanessa Passarelli**, entre outros) por nunca se distanciarem, independente dos caminhos diferentes que seguimos. Vocês são muito importante para mim, marcaram a minha vida e levarei comigo por onde quer que eu ande. Obrigada amigas.

Eu agradeço a todo o pessoal do Laboratório, **Hellen, Andréia, Mariana, Marco, Vanessa, Matheus, Juan, Caroline, Ana Carolina, Karina, Fernanda, Kelvin, Graziela, Rogério, Maísa, Fábio, Iara, Vinicius**, entre outros, por toda ajuda sem medirem esforços, por todo companheirismo e por alegrarem os meus dias de trabalho. Me sinto muito orgulhosa de fazer parte desse grupo sensacional, verdadeiros exemplos de relacionamento em equipe, união e profissionalismo.

Agradeço a minha amiga **Priscila**, pela sua amizade e companheirismo. Por sempre me ouvir, me dar conselhos com seu “sotaque” mineiro rs. Por me conhecer

muito mais que eu imagino e participar de todos os momentos da minha vida. Amizade que vou levar para sempre, “Is We”.

Eu agradeço a minha Pós-Doc. **Sarah Martorelli**, pela ajuda em todos os momentos que precisei.

Agradeço ao meu companheiro de trabalho **André Villacis**, por toda a sua paciência e dedicação com o meu trabalho. Por toda a assistência no decorrer de todo o meu Mestrado, até mesmo quando está longe em dias de descanso não mede esforços para me ajudar. Obrigada por tudo, sem sua ajuda não teríamos concluído esse trabalho. Espero que sempre sejamos companheiros de trabalho, pois cresci muito com você.

Agradeço a minha companheira de trabalho **Luisa Matos**, por toda ajuda em todos os dias, noites, sábados e domingos trabalhando ao meu lado no laboratório nessa reta final. Por todo o seu cuidado com as minhas coisas em mínimos detalhes e por todo seu companheirismo. Muito obrigada Lu, sem sua ajuda teria ficado muito mais complicado.

Agradeço a minha Co-Orientadora Dra^a **Maria Isabel Achatz**, por permitir a continuidade em um dos trabalhos do seu grupo, por se fazer presente no desenvolvimento de todo o estudo e por não medir esforços para nos fornecer todas as informações necessárias.

Agradeço ao grupo da Oncogenética **Amanda, Andréia, Karina, Fernanda, Kelvin**, por toda ajuda no decorrer de todo o meu trabalho.

Agradeço a **Dra^a Patricia Prolla** e a **Dra^a Juliana Giacomazzi** de Porto Alegre, por terem contribuído com todos os dados de alguns dos pacientes deste estudo e nos dando toda assistência quanto às informações necessárias no decorrer do seu desenvolvimento.

Agradeço a todos os pacientes e familiares que aceitaram a contribuir com o nosso trabalho. Sem a participação de vocês nada disso estaria acontecendo.

Agradeço a Pós-Graduação do AC Camargo Cancer Center, **Vanuza, Ana, Reinaldo, Luciana**, por toda ajuda, atenção e paciência durante todo esse período.

Agradeço ao Banco de Macromoléculas do AC Camargo Cancer Center, **Louise** e toda equipe, pela agilidade e competência para termos as melhores amostras.

Agradeço a biblioteca do AC Cancer Center, **Sueli** e toda a equipe, por sempre estarem dispostos a nos ajudar com toda a dedicação possível, nos fornecendo artigos, formatação de Dissertação, entre outras.

Agradeço ao CEP do AC Camargo Cancer Center, **Rúbia e Tamara**, por toda a paciência nas inúmeras vezes que liguei pedindo informações.

Agradeço ao pessoal do Escritório de Projetos do AC Camargo Cancer Center, **Carla, Gilmara, Rogério** e toda a equipe, pela ajuda, organização e dedicação com todos os alunos.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (**CAPES**), pelo suporte financeiro.

Agradeço a todos do **AC Camargo Cancer Center**, por tornarem esse Centro de atendimento e pesquisa em câncer, uma referência Nacional e Internacional. Sinto muito orgulho em fazer parte dessa equipe onde se encontram alguns dos melhores Pesquisadores do Brasil. O meu desejo é que possamos subir cada vez mais. Obrigada por tudo!

RESUMO

Basso TR. **Alterações genômicas em pacientes portadores de múltiplos tumores primários negativos para mutações no gene *TP53***. São Paulo; 2014. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente]

Mutações germinativas no gene *TP53* são características de 80% dos pacientes com a Síndrome de Li-Fraumeni (LFS) e 40% dos pacientes com a Síndrome Li-Fraumeni like (LFL). A LFL/LFS estão associadas com a predisposição hereditária ao desenvolvimento de uma variedade de tumores incluindo múltiplos tumores primários. O objetivo deste estudo foi avaliar as alterações genômicas de 27 pacientes com LFL e portadores de múltiplos tumores primários sem mutações germinativas patogênicas no gene *TP53*. Quinze pacientes preencheram os critérios clínicos de Eeles1, Eeles2 ou Chompret e foram classificados como LFL. Doze pacientes apresentaram múltiplos tumores primários e não se enquadraram nos critérios clínicos clássicos de nenhuma síndrome hereditária associada com câncer, sendo classificados como MT. As alterações genômicas foram avaliadas utilizando a plataforma de microarranjos de alta densidade *Affymetrix CytoScan™ HD*, que permite a detecção de variações no número de cópias genômicas (do inglês, *copy number variations* - CNVs) e regiões com ausência de heterozigose sem variação no número de cópias (do inglês, *copy-neutral Loss of Heterozygosity* - cnLOH). Os dados foram analisados pelo software *Chromosome Analysis Suite* (ChAS v2.1, Affymetrix). Os pacientes LFL apresentaram 332 alterações genômicas (158 ganhos, 119 perdas e 55 cnLOHs), enquanto nos pacientes MT foram detectadas 193 alterações (73 ganhos, 84 perdas e 36 cnLOHs). No total, identificamos 304 alterações raras e novas raras em ambos os grupos de pacientes. O caso LFL-4 foi o único que apresentou apenas CNVs comuns. Entre os pacientes LFL, o LFL-8, apresentou o maior número de alterações raras e novas raras (109), sendo uma deleção em mosaicismo do cromossomo X, confirmada por análise cromossômica (28% de células 46, XX e 72% com cariótipo 45, X). Embora genotipicamente este seja um caso de Síndrome de Turner, a paciente não apresenta nenhum sinal

fenotípico característico da síndrome. Uma grande alteração no cromossomo 7 foi encontrada em dois casos específicos: a deleção em mosaicismo em 7q22.1 (42 Mb) no caso MT-2 e a cnLOH em 7q22.1-q34 (49Mb) no caso MT-4. Uma alteração menor e contida nessa região (10Mb) foi descrita em literatura em um único caso da literatura em um paciente com esquizofrenia. Quatro pacientes (LFL-11, LFL-14, MT-8 e MT-14) apresentaram um grande número de cnLOHs envolvendo mais de 5000 genes, entre eles supressores tumorais e oncogenes. Foram comparadas todas as alterações genômicas entre os pacientes LFL, MT e entre os dois grupos de pacientes revelando que vários casos compartilhavam as mesmas alterações. Um significativo número de alterações envolviam genes descritos em literatura como associados com processos tumorais. A comparação entre as alterações raras e novas raras dos casos LFL e MT identificou 11 genes alterados (*ARHGEF9*, *ASB12*, *FAM123B*, *FRMD8P1*, *LASIL*, *LOC92249*, *MSN*, *MTMR8*, *SPIN4*, *ZC3H12B*, *ZC4H2*) comuns a nove casos, sendo que cinco deles desenvolveram neoplasias de tireóide. Em conclusão, foi possível verificar que os pacientes LFL e MT apresentam um número elevado de alterações genômicas raras e novas raras sendo que várias delas são comuns em diferentes pacientes e tem potencial para contribuir para o desenvolvimento de diversos tumores nestes pacientes. A metodologia utilizada permitiu a identificação de mosaicismos incluindo uma paciente com Síndrome de Turner sem sinais fenotípicos clássicos e um caso com uma grande perda genômica em 7q. Estes resultados contribuem para o aconselhamento genético destas famílias e para a caracterização de genótipos particulares.

SUMMARY

Basso TR. **[Genomic alterations in patients with multiple primary tumors negative for mutations in *TP53* gene]**. São Paulo; 2014. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente]

Germline mutations in *TP53* gene are characteristic of 80% of Li-Fraumeni Syndrome (LFS) patients, and 40% of Li-Fraumeni like Syndrome (LFL). The LFL/LFS are associated with inherited predisposition to several tumors and multiple primary tumors development. This study aims to evaluate genomic alterations of 27 patients with LFL and multiple primary tumors carrying no pathogenic mutations in *TP53* gene. Out of all patients, 15 were diagnosed with LFL by Eeles 1, Eeles 2, or Chompret criteria. On the other hand, 12 patients had multiple primary tumors but did not fulfill any hereditary syndrome clinical criteria, being classified as MT. Genomic alterations were evaluated using the high density array platform Affymetrix CytoScan™ HD, that allows the detection of genomic copy number variations (CNVs) and copy-neutral loss of heterozygosity (cnLOH) regions. The resulting data were analyzed through Chromosome Analysis Suite software (ChAS v2.1, Affymetrix). The LFL group of patients presented 332 genomic alterations (158 gains, 119 losses, and 55cn-LOH) whereas, 193 genomic alterations were detected in the MT group (73 gains, 84 losses, and 36 cn-LOHs). A total of 304 alterations classified as “rare” or “new rare” were identified among the patients of both groups. The LFL-4 case solely presented common CNVs. Among LFL patients, the case LFL-8 had more alterations than all other cases in LFL group (109), including a mosaic deletion of chromosome X confirmed by karyotyping (28,4% of 46, XX cells, and 73,6% of 45, X cells). Although this case is classified genotypically as a mosaic Turner Syndrome, the patient LFL-8 does not have any phenotype that fulfills the Syndrome criteria. A large alteration in chromosome 7 was detected in two specific cases: a deletion at 7q22.1 (42Mb) in case MT-2, and a cn-LOH mapped at 7q22.1-q34 (49Mb) in case MT-4. A smaller alteration within the same region (10Mb) was described previously in only one study in a patient with schizophrenia. Four patients

(LFL-11, LFL-14, MT-8 and MT-14) presented an extensive number of cn-LOHs covering more than 5000 genes, including tumor suppressors and oncogenes. We compared the alterations among the LFL and MT patients, and between the two groups, unraveling that several cases shared the same alterations. A significant number of alterations carried previously described genes associated with tumor processes. The analysis of rare and new rare alterations of both groups identified 11 altered genes (*ARHGEF9*, *ASB12*, *FAM123B*, *FRMD8P1*, *LASIL*, *LOC92249*, *MSN*, *MTMR8*, *SPIN4*, *ZC3H12B*, *ZC4H2*) identified in nine cases, five of which had developed thyroid neoplasia. In summary, we were able to identify that both LFL and MT group of patients carry a large number of rare and new rare genomic alterations shared by different patients that can potentially lead to the development of a variety of tumors in these patients. The used methodology allowed the identification of mosaic alterations, including a patient with Turner Syndrome with no clinical features, and a patient bearing a large genomic deletion in 7q. These findings have implications for the genetic counseling of these families, and for characterization of individual genotypes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Etapas do protocolo <i>CytoScan HD Array</i>	36
Figura 2	Número de alterações raras e novas raras encontradas em cada caso no grupo de pacientes com Síndrome de Li-Fraumeni <i>like</i>	43
Figura 3	Número e tipo de alterações genômicas (raras e novas raras) identificada por cromossomo no grupo de pacientes com a Síndrome de Li-Fraumeni <i>like</i>	56
Figura 4	A paciente LFL-4 apresentou três neoplasias e não teve histórico familiar de neoplasias.....	58
Figura 5	A paciente LFL-6 apresentou duas neoplasias e história familiar de câncer de mama e de pulmão.....	60
Figura 6	Perda em mosaicismo do cromossomo X na paciente LFL-8, visualizada no <i>ChAS</i>	62
Figura 7	Cariótipo obtido após bandamento em DAPI-reverso revelando mosaicismo 45,X/46,XX característico da Síndrome de Turner.....	63
Figura 8	A paciente LFL-8 apresentou duas neoplasias e extensa história familiar de câncer.....	65
Figura 9	A paciente LFL-11 apresentou duas neoplasias e avó materna com câncer de SNC e de tireoide, assim como primas maternas com leucemia, câncer de colo de útero e linfoma de Hodgkin.....	67
Figura 10	A paciente LFL-14 apresentou três e história familiar de câncer de	70

	próstata, câncer de mama e leucemia.....	
Figura 11	Número de alterações genômicas raras e novas raras detectadas em cada caso do grupo de pacientes com múltiplos tumores primários.....	76
Figura 12	Número e tipo de alterações genômicas raras e novas raras identificadas por cromossomo no grupo de pacientes com múltiplos tumores primários.....	82
Figura 13	O paciente MT-13 apresentou duas neoplasias.....	84
Figura 14	Imagem gerada pelo software <i>Chromosome Analysis Suite (ChAS Affymetrix)</i> mostrando o perfil de alterações genômicas observadas no cromossomo 7 para a paciente MT-2.....	86
Figura 15	A paciente MT-2 apresentou quatro neoplasias.....	87
Figura 16	Imagem gerada pelo software <i>Chromosome Analysis Suite (ChAS Affymetrix)</i>	89
Figura 17	Paciente MT-4 sexo feminino pertencente ao grupo de múltiplos tumores apresenta duas neoplasias melanoma aos 42 anos de idade e câncer de mama aos 43 anos.....	90
Figura 18	A paciente MT-14 apresentou duas neoplasias.....	92
Figura 19	Avaliação por enriquecimento gênico das alterações identificadas em grupos de pacientes Li-Fraumeni-like e com múltiplos tumores.....	98

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Critérios adotados para a categorização de pacientes na Síndrome de Li-Fraumeni e suas variantes.....	4
Quadro 2	Descrição clínica dos 15 pacientes portadores da Síndrome de Li-Fraumeni <i>like</i>	25
Quadro 3	Descrição clínica dos 12 pacientes portadores de múltiplos tumores (MT).....	29
Quadro 4	Condições da PCR para os genes <i>BRCA1</i> e <i>BRCA2</i>	37
Quadro 5	Resumo das alterações genômicas detectadas nos pacientes LFL.....	41
Quadro 6	Alterações raras e novas raras encontradas em 14 dos 15 pacientes LFL, assim como o número de genes mapeados em cada região.....	44
Quadro 7	Alterações genômicas compartilhadas entre os pacientes com a síndrome de Li-Fraumeni <i>like</i>	70
Quadro 8	Tipo e classificação das alterações encontradas nos pacientes MT.....	73
Quadro 9	Alterações raras e novas raras encontradas nos 12 pacientes MT assim como o número de genes mapeados em cada região.....	76
Quadro 10	Alterações encontradas no gene <i>BRCA2</i> de acordo com o banco de dados BIC e nomenclaturas HGVS.....	84
Quadro 11	Alterações encontradas nos genes <i>BRCA1</i> e <i>BRCA2</i> de acordo com o banco de dados BIC e nomenclatura HGVS.....	87

Quadro 12	Alterações genômicas compartilhadas entre os pacientes que apresentaram tumores múltiplos.....	92
Quadro 13	Alterações genômicas (raras e novas raras) compartilhadas entre os pacientes classificados como múltiplos tumores e os pacientes portadores da Síndrome de Li-Fraumeni <i>like</i>	94

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADR	Carcinoma Adrenocortical
BIC*	Breast Cancer Information Core
BRLMM-p*	Bayesian Robust Linear with Mahalanobis
BRT	Braquiterapia
CA	Câncer
CCR	Câncer Colorretal
CEC	Carcinoma Epidermóide
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CGH*	Comparative Genomic Hybridization
ChAS*	Chromosome Analysis Suite
cnLOH*	Copy Neutral Loss of Heterozygosity
CNV*	Copy Number Variation
DAPI*	4'6-diamidino-2-phenylindole
DGV*	Database of Genomic Variants
DNA*	Deoxyribonucleic Acid
dNTP*	Deoxynucleotide Triphosphates
Fish*	Fluorescence In Situ Hybridization
G	Ganho
gDNA*	Genomic Deoxyribonucleic Acid
h	hora
HBOC*	Hereditary Breast and Ovarian Cancer Syndrome
HDGC*	Hereditary Diffuse Gastric Cancer Syndrome
HGVS*	Human Genome Variation Society
HMM*	Hidden Markov Model
IARC*	International Agency for Cancer Research
IDH	Índice de Desenvolvimento Humano
INCA	Instituto Nacional do Câncer
ISCN*	International System for Human Cytogenetic Nomenclature
Kb*	Kilo base

KCl	Cloreto de Potássio
LH	Linfoma Hodgkin
LiFE*	Li-Fraumeni Exploration
LFL*	Li-Fraumeni Like
LFS*	Li-Fraumeni Syndrome
LNH	Linfoma Não Hodgkin
LOH*	Loss of Heterozigosity
M	Concentração Molar
Mb*	Mega base
Mg²⁺	Magnésio
min	minuto
mL	Mililitro
MLPA*	Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification
MSI*	Microsatellite Instability
MSS*	Microsatellite Stable
MT	Múltiplos Tumores
Na₃C₆H₅O₇	Citrato de sódio
NaCl	Cloreto de sódio
ng	nanograma
OMS	Organização Mundial da Saúde
P	Perda
pH	Potencial Hidrogeniônico
PCR*	Polymerase Chain Reaction
QT	Quimioterapia
RefSeq*	Reference Sequence
RIT	Radioiodoterapia
RNA*	Ribonucleic Acid
rpm	rotação por minuto
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Radioterapia
seg	segundos
SNP*	Single-Nucleotide Polymorphism

SNC	Sistema Nervoso Central
SO	Sarcoma Ósseo
SPHC	Síndrome de Predisposição Hereditária ao Câncer
SPM	Sarcoma de Partes Moles
UPD	Unidissomia Parental
VNTR *	Variable Number of Tandem Repeats

*siglas ou abreviaturas derivadas do inglês;

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Câncer e Predisposição Hereditária	1
1.2	Pacientes com a Síndrome de Li-Fraumeni e Li-Fraumeni like	2
1.3	Pacientes com Múltiplos Tumores Primários	9
1.4	Diagnóstico Diferencial nas Síndromes de Predisposição Hereditária ao Câncer	12
1.5	Variações do Número de Cópias de DNA (CNV)	14
1.6	Regiões de Homozigose Sem Variação No Número de Cópias - cnLOH	17
2	JUSTIFICATIVA	20
3	OBJETIVOS	21
3.1	Objetivo Geral.....	21
3.2	Objetivos Específicos.....	21
4	MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1	Caracterização da amostra	23
4.2	Obtenção do DNA Genômico (gDNA).....	33
4.3	Deteção de Alterações Genômicas (SNPs e CNVs).....	34
4.4	Deteção de Mutações em BRCA1 e BRCA2 por Sequenciamento direto (Sanger).....	37
4.5	Análise Citogenética	39
5	RESULTADOS	41
5.1	Pacientes Diagnosticados com a Síndrome de Li-Fraumeni like.....	41
5.2	Pacientes Portadores de Múltiplos Tumores Primários	74
5.3	Regiões Genômicas Raras e Novas Raras Compartilhadas entre os Casos Portadores Da Síndrome de Li-Fraumeni like e os Casos com Múltiplos Tumores Primários	93

6	DISCUSSÃO.....	99
7	CONCLUSÕES.....	128
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	130

ANEXOS

Anexo 1 Carta de aprovação do projeto no Comitê de Ética em Pesquisa do
A.C. Cancer Center

Anexo 2 Heredogramas das famílias não apresentados no texto

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER E PREDISPOSIÇÃO HEREDITÁRIA

O câncer é uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima um aumento de quase 75% de novos casos de câncer em 2030 comparado com 2008, passando de 12,7 milhões para 22,2 milhões de pessoas acometidas por esta doença (BRAY et al. 2012).

Em países com médio e alto Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) prevalecem as neoplasias de mama, pulmão e cólon-retos. Por outro lado, nos países com baixo IDH predominam os tumores de estômago, fígado e colo de útero (BRAY et al. 2012). No Brasil, as estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA) para o ano de 2012, válidas também para 2013, apontam para a ocorrência de 518.510 novos casos de câncer. Sem considerar os tumores de pele não-melanoma, o câncer de próstata é o mais prevalente em homens da região Sudeste (78/100 mil), enquanto o câncer de mama é prevalente entre as mulheres (69/100 mil) (Ministério da Saúde 2013).

Estima-se que 5 a 10% de todos os tumores malignos detectados sejam hereditários e que 20 a 30% correspondam a agrupamentos familiares de câncer (LINDOR et al. 2008). Indivíduos jovens com câncer que apresentam múltiplas neoplasias e/ou pacientes com vários familiares acometidos por tumores podem ser portadores de síndromes de predisposição hereditária ao câncer (SPHC) (TUCKER e FRIDMAN 2002). Neste caso, uma parcela significativa destes pacientes apresenta

mutações germinativas em genes (principalmente supressores de tumor) de alta penetrância e um elevado risco de desenvolver múltiplos tumores ao longo da vida (TUCKER e FRIDMAN 2002; ALMEIDA e STRATAKIS 2010).

As principais SPHC e os genes preferencialmente mutados associadas a elas são: Síndrome de Li-Fraumeni, envolvendo mutações em *TP53*; Síndrome do Câncer de Mama e Ovário Hereditário, associada principalmente a mutações em *BRCA1* e *BRCA2*; Síndrome de Lynch, relacionada a mutações em genes de reparo a erros de pareamento (incluindo *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* e *PMS2*) e Polipose Adenomatosa Familiar, envolvendo mutações no gene *APC* (LINDOR et al. 2008; CYBULSKI et al. 2011; BUERKI et al. 2012).

A detecção de famílias com indivíduos afetados por câncer hereditário, assim como o melhor entendimento das SPHC são imprescindíveis para a adoção de medidas de rastreamento mais efetivas na identificação precoce de tumores nestes pacientes (ACHATZ 2008; LINDOR et al. 2008).

1.2 PACIENTES COM A SÍNDROME DE LI-FRAUMENI E LI-FRAUMENI LIKE

A Síndrome de Li-Fraumeni (LFS) foi descrita em 1969 por Frederick Joseph Li e Joseph F. Fraumeni a partir de um estudo epidemiológico em crianças portadoras de rhabdomyosarcoma e com história familiar de câncer (LI e FRAUMENI 1969a; 1969b; FREBOURG et al. 2001). LI e FRAUMENI (1969a, b) associaram esta síndrome à famílias com múltiplos indivíduos afetados por tumores antes dos 45 anos de idade. As principais neoplasias descritas nestes pacientes são os sarcomas de

partes moles, osteossarcomas, carcinomas de mama, tumores do sistema nervoso central e carcinomas adrenocorticais (LI et al. 1988; MALKIN et al. 1990). Algumas famílias apresentam um espectro tumoral mais amplo, incluindo tumores de células germinativas, papilomas do plexo coróide, tumor de Wilms, assim como neoplasias de mama, pulmão, estômago, cólon, pâncreas, esôfago e melanoma (GARBER et al. 1990; HARTLEY et al. 1993; VARLEY et al. 1997; BIRCH et al. 2001). A LFS tem herança autossômica dominante.

Visando definir o diagnóstico clínico de famílias com tumores típicos da LFS e em idade precoce, porém, sem o fenótipo clássico da LFS, uma classificação adicional foi proposta, sendo denominada Li-Fraumeni variante ou Li-Fraumeni *like* (LFL) (BIRCH et al. 1994). Posteriormente, critérios mais abrangentes foram propostos englobando outros pacientes e familiares com tumores em idade precoce (EELES 1995; FREBOURG et al. 2001). O Quadro 1 descreve os critérios clínicos utilizados para classificar as famílias em LFS clássica e suas variantes.

Quadro 1 - Critérios adotados para a categorização de pacientes na Síndrome de Li-Fraumeni e suas variantes.

DIAGNÓSTICO	CRITÉRIOS
Síndrome de Li-Fraumeni clássica	Sarcomas na infância ou em idade jovem (< 45 anos) E Familiar de primeiro grau com qualquer câncer em idade jovem (< 45 anos) E Familiar de primeiro ou segundo grau que tenha o diagnóstico de câncer em idade jovem (antes dos 45 anos) ou sarcoma em qualquer idade.
Variante Birch	Câncer na infância ou sarcoma, SNC ou ADR antes dos 45 anos E Familiar de primeiro grau ou segundo grau com câncer típico da síndrome de Li-Fraumeni (sarcoma partes moles, câncer de mama, SNC, ADR ou leucemia) em qualquer idade E Familiar de primeiro ou segundo grau com qualquer câncer antes dos 60 anos.
Critérios de Eeles	LFL-E1 - Presença de dois familiares de primeiro ou segundo grau com tumor típico em qualquer idade (sarcoma, câncer de mama, tumor SNC, leucemia, ADR, melanoma, câncer de próstata, câncer pancreático). LFL-E2 - Sarcoma em qualquer idade no paciente índice com dois dos seguintes tumores (podendo estar presente no mesmo indivíduo): câncer de mama <50anos e/ou tumor SNC, leucemia, ADR, melanoma, câncer de próstata, câncer pancreático <60 anos ou sarcoma em qualquer idade.
Critérios de Chompret modificado	Paciente com câncer típico da Síndrome de Li-Fraumeni (sarcomas de partes moles, osteosarcoma, câncer de mama pré-menopausa, SNC, ADR, leucemia e carcinoma broncoalveolar de pulmão) antes dos 46 anos E Familiar de primeiro e segundo grau com câncer típico da Síndrome de Li-Fraumeni antes dos 56 anos (exceto câncer de mama caso o probando tenha câncer de mama) ou múltiplos tumores OU Pacientes com múltiplos tumores, sendo pelo menos dois do espectro da LFS e o primeiro antes dos 46 anos OU ADR em qualquer idade ou câncer de mama antes dos 36 anos sem mutação nos genes <i>BRCA1</i> e <i>BRCA2</i> .

SNC: sistema nervoso central; ADR: carcinoma adrenocortical; LFL-E1: Síndrome de Li-Fraumeni *Like*, critérios de Eeles1; LFL-E2: Síndrome de Li-Fraumeni *Like*, critérios de Eeles2.

O diagnóstico molecular da LFS/LFL é realizado pela identificação de mutações germinativas patogênicas no gene *TP53*, independente do histórico familiar (LI et al. 1988; BIRCH et al. 1994; CHOMPRET et al. 2001; BOUGEARD et al. 2008; TINAT et al. 2009). Até o momento, o *TP53* é o único gene conhecido associado à LFS/LFL (MALKIN 2011). Estudos moleculares demonstraram que

aproximadamente 80% dos indivíduos diagnosticados clinicamente com a LFS e 40% dos casos de LFL apresentam mutações germinativas patogênicas em *TP53* (NAGY et al. 2004; VARLEY 2003; BOUGEARD et al. 2008).

O gene *TP53* está mapeado em 17p13.1 e é composto por 11 éxons que codificam uma proteína de 393 aminoácidos (para revisão, MAY e MAY 1999). A fosfoproteína nuclear p53 apresenta seis domínios principais e sua expressão pode ser regulada em diferentes níveis dos processos de transcrição e tradução (HOLLSTEIN e HAINAUT 2010).

A p53 é um fator de transcrição que responde ao estresse celular, modulando a expressão de genes alvo que induzem a parada do ciclo celular, apoptose, senescência, reparo do DNA e mudanças no metabolismo. Além disso, a proteína p53 também pode ativar a apoptose por processos citoplasmáticos não transcripcionais (XU-MONETTE et al. 2012). Mutações no gene *TP53*, especialmente *missense*, podem inativar a proteína p53 e permitir que as células se multipliquem com erros no DNA, acumulando mutações potencialmente danosas e promovendo a tumorigênese (TOLEDO e WAHL 2006; BOURDON 2007; VOUSDEN e LANE 2007; HOLLSTEIN e HAINAUT 2010; ZERDOUMI et al. 2013).

O banco de dados sobre mutações em *TP53*, mantido pelo *International Agency for Cancer Research-IARC*, agrega informação de 28717 mutações somáticas e 1485 mutações germinativas descritas neste gene (PETITJEAN et al. 2007a, R17, novembro de 2013). Os sítios tumorais associados com mutações germinativas em *TP53* incluem: carcinomas de mama (27,8%), tumores de partes moles (13,8%), SNC (12,9%), tumores da glândula adrenal (10,9%), sistema esquelético (8,7%), entre outros (PETITJEAN et al. 2007a, R17, novembro de 2013).

Além disso, mutações germinativas em diferentes sítios do gene foram descritas na LFS/LFL, sendo associadas à heterogeneidade dos tumores nestas famílias (VOGELSTEIN et al. 2000; PETITJEAN et al. 2007b; HAFSI e HAINAUT 2011; JOHNSON e PERKINS 2012; XU-MONETTE et al. 2012).

A presença de mutações germinativas no gene *TP53* foi observada em diferentes tipos tumorais de pacientes sem história familiar de câncer. Estima-se que até 10% das crianças que apresentam tumores cerebrais, sem histórico familiar de câncer, são portadores de mutações germinativas em *TP53* (FELIX et al. 1995; LI et al. 1995). Estudos em pacientes com sarcomas revelaram que 9% dos casos com rabdomyosarcomas e 2-3% com osteossarcomas apresentam mutações germinativas no mesmo gene, independente de terem ou não história familiar de outros tumores (MCINTYRE et al. 1994; DILLER et al. 1995). Estudo recente identificou 17 mutações *de novo* (sete confirmadas) em um grupo de 75 pacientes com mutações germinativas em *TP53* (GONZALEZ et al. 2009). Mais recentemente, MITCHELL et al. (2013) avaliaram 559 adultos com sarcomas e identificaram 17 indivíduos com mutações germinativas em *TP53*, dos quais sete não apresentaram história de câncer na família. A presença de mutações germinativas em *TP53* na ausência de história familiar pode ser explicada pela ocorrência de mutações *de novo*.

No Brasil, RIBEIRO et al. (2001) identificaram uma mutação germinativa específica no domínio de oligomerização do gene *TP53* (rs121912664) em crianças com carcinomas adrenocorticais, mas sem história familiar de câncer. Posteriormente, estudo de ACHATZ et al. (2007) avaliou 45 pacientes com LFL/LFS e encontrou a mesma mutação no *TP53* em seis indivíduos. Esta mutação promove, uma troca de arginina por uma histidina no códon 337 do éxon 10 (CGC por CAC),

desestabilizando o pH celular e interferindo na ligação dos dímeros da p53 (ACHATZ et al. 2007).

Recentemente, GIACOMAZZI et al. (2013) avaliaram 292 crianças com tumores do espectro da LFS/LFL e encontraram a mutação *p.R337H* em 11 pacientes, sendo que 9 desenvolveram carcinoma adrenocortical e dois carcinoma de plexo coróide. Estes dados levaram os autores a sugerir que pacientes com estas neoplasias devem ser rastreados para mutações no gene *TP53*. A mutação *p.R337H* é possivelmente decorrente de um efeito fundador e está presente em 0,3% da população do Sul e Sudeste do Brasil (aproximadamente 300.000 indivíduos), tornando-a um dos alelos de predisposição ao câncer mais frequentes (ACHATZ et al. 2007). A frequência desta mutação pode ser considerada semelhante às três mutações, que ocorrem nos genes *BRCA1* (185delAG e 5382insC) e *BRCA2* (6174delT), descritas como fundadoras na população *Ashkenazi* (ROA et al. 1996).

Em uma análise populacional de rastreamento para câncer de mama em Porto Alegre, foram avaliadas 750 mulheres para a presença da mutação *p.R337H*. No estudo foram incluídas apenas mulheres assintomáticas que não apresentavam histórico de câncer ou neoplasias familiares. Duas participantes apresentaram a mutação *p.R337H* (parentes de quarto grau) e apresentavam uma história familiar de múltiplos tumores que não se enquadravam nos critérios clássicos para LFS e suas variantes. A mesma mutação também foi identificada em três outras mulheres desta família, das quais uma desenvolveu câncer de mama aos 36 anos. Os resultados deste estudo indicaram que a mutação *p.R337H*, frequentemente observada na população do sul do Brasil, predispõe a vários tipos de câncer (PALMERO et al. 2008).

Além do envolvimento do gene *TP53* na LFS e na LFL, foram também relatados polimorfismos modificadores de risco. O haplótipo G do polimorfismo de base única (do inglês, *single nucleotide polymorphism* - SNP) 309 no gene *MDM2* (rs2279744) foi associado com o aparecimento de tumores em pacientes em idade precoce que eram portadores ou não de mutações germinativas em *TP53* (RUIJS et al. 2007; TABORI et al. 2007; WU et al. 2011).

Recentemente foi demonstrado que mulheres com o haplótipo C do *SNP285* (rs117039649) no *MDM2* apresentavam um menor risco de desenvolver câncer de mama, ovário e endométrio apesar da presença do haplótipo G do *SNP309* (KNAPPSKOG e LØNNING 2011; KNAPPSKOG et al. 2012); Em pacientes com a LFS, RENAUX-PETEL et al. (2013) relataram que aqueles com haplótipos G para ambos os SNPs desenvolveram tumores cinco anos antes do que aqueles com outros haplótipos, confirmando que o haplótipo G do *SNP309* do gene *MDM2* apresenta função deletéria quando não é neutralizado pelo haplótipo C do *SNP285*.

Os mecanismos de regulação da expressão do gene *TP53* também foram avaliados em famílias LFS não portadoras de mutação em *TP53*. FINKOVA et al. (2009) demonstraram que o promotor do gene *TP53* não é metilado nestas famílias, excluindo a participação de mecanismos epigenéticos na determinação do fenótipo da Síndrome.

O fato de algumas famílias com LFS/LFL não apresentarem mutações germinativas em *TP53* sugere a participação de outros genes no desenvolvimento da doença. Alguns genes da via do *TP53*, relacionados a apoptose ou ao controle do ciclo celular, como *TP63*, *BCL10*, *BAX*, *CDKN2A*, *PTEN* e *CHEK1* foram considerados potenciais candidatos no desenvolvimento da síndrome. No entanto, até

a presente data os dados disponíveis não permitem a confirmação dessa hipótese (BELL et al. 1999; VAHTERISCO et al. 2001, MALKIN 2011). O gene *CHEK2* também foi associado com a LFS/LFL, porém, foram detectadas poucas famílias com a alteração e os dados não foram estatisticamente significativos (SODHA et al. 2002).

O consórcio *Li-Fraumeni Exploration (LiFE)* iniciou-se em 2010 como um empreendimento internacional que permitiu a elaboração de novas estratégias para a detecção de pacientes com risco de desenvolvimento de câncer, assim como a determinação de diretrizes para o rastreamento de mutações em *TP53* em pacientes assintomáticos pertencentes a famílias com LFS/LFL. No entanto, estudos recentes demonstraram que os critérios utilizados para a detecção de pacientes com LFS/LFL ainda são limitados, sendo necessárias novas abordagens para a avaliação das alterações genéticas e manifestações clínicas da LFS/LFL, especialmente em indivíduos não portadores de mutações germinativas em *TP53* (MAI et al. 2012).

1.3 PACIENTES COM MÚLTIPLOS TUMORES PRIMÁRIOS

Os indivíduos com múltiplos tumores primários ou com vários membros da família acometidos por neoplasias são sugestivos de pertencerem a alguma SPHC (TUCKER e FRIDMAN 2002; MALKIN 2011). Não entanto, há pacientes com história de múltiplos tumores primários que não se enquadram nos critérios clínicos clássicos das SPHC, da mesma forma, existem indivíduos que preenchem critérios clínicos de síndromes hereditárias de câncer, mas não apresentam mutações patogênicas nos genes previamente associados com estas síndromes (LINDOR et al.

2008). Por exemplo, 40% dos pacientes que preenchem os critérios de Amsterdam para a Síndrome de Lynch não apresentam mutações patogênicas nos genes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* ou *PMS2*; ao passo que 75% dos indivíduos que se enquadram nos critérios de Chompret para a LFL não exibem mutações em *TP53* (LINDOR et al. 2005; BOUGEARD et al. 2008).

Uma busca em literatura identificou menos de 100 relatos descrevendo pacientes com múltiplos tumores primários e mutações germinativas no *TP53*. Há relatos de pacientes portadores de mutações em *TP53* com mais de cinco tumores primários, como os descritos por IZAWA et al. (2008) (nove tumores primários) e NUTTING et al. (2000) (17 tumores primários). Mais recentemente, KAST et al. (2012) relataram uma paciente com LFL (Critérios de Eeles) que apresentou cinco tumores primários iniciando aos 40 anos (mixofibrossarcoma em braço direito, carcinoma ductal invasivo bilateral de mama e lipossarcoma periadrenal) e na qual foi detectada uma mutação *de novo* no *TP53*.

A incidência de múltiplos tumores primários foi avaliada em 200 indivíduos, pertencentes a 200 famílias com a LFS, quando comparados à população em geral (HISADA et al. 1998). O risco relativo de um segundo tumor primário foi estimado em 5,3%, com uma probabilidade acumulada de 57% até 30 anos após o diagnóstico da primeira neoplasia. HISADA et al. (1998) também sugeriram que alguns segundos tumores primários foram radio-induzidos, uma vez que seis pacientes desenvolveram oito tumores em áreas previamente irradiadas num período de 3 a 22 anos após o tratamento radioterápico.

O desenvolvimento de tumores primários em áreas submetidas à radioterapia já foi relatado por vários estudos e é mais prevalente em crianças e adultos jovens

(NEGLIA et al. 2006; KLEINERMAN 2009; MEADOWS et al. 2009; HARBRON et al. 2013). Em um estudo recente, HARBRON et al. (2013) relataram que pacientes com câncer (idade entre 0 e 29 anos) tratados com radioterapia apresentaram um risco quase cinco vezes maior de desenvolver outra neoplasia quando comparados à população em geral na mesma faixa etária. Os cânceres radio-induzidos mais comuns foram os de sistema nervoso central (28%), sarcomas (25%) e leucemias (19%).

Há relatos evidenciando que pacientes com mutações germinativas em *TP53* apresentam um risco aumentado para o desenvolvimento de neoplasias em áreas previamente tratadas com radioterapia (HISADA et al. 1998; NUTTING et al. 2000; EVANS et al. 2006; SALMON et al. 2007; HEYMANN et al. 2010). Estudos pré-clínicos mostraram que células com mutações no *TP53* submetidas à radiação têm um aumento na instabilidade genômica devido a recombinações errôneas, facilitando o desenvolvimento de um novo tumor (CUDDIHY e BRISTOW 2004). Em estudos com camundongos tratados com baixas doses de radioterapia também foram observados uma aceleração na formação de tumores e uma maior taxa de malformações em animais heterozigotos/homozigotos para mutações no *TP53* (KEMP et al. 1994; KATO et al. 2001; BAATOUT et al. 2002). Esses dados indicam que a radioterapia deve ser evitada ou utilizada em baixas doses no tratamento de pacientes LFS com mutações germinativas em *TP53* (KAST et al. 2012).

1.4 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL NAS SÍNDROMES DE PREDISPOSIÇÃO HEREDITÁRIA AO CÂNCER

Existe em literatura uma série de síndromes hereditárias ao câncer que apresentam fenótipos que se sobrepõem. Por exemplo, a alta incidência de tumores de mama em idade jovem é uma característica marcante da LFS/LFL, porém, estes tumores também podem ser detectados em outras SPHC, como a Síndrome Hereditária de Câncer de Mama e Ovário (HBOC), Síndrome de Cowden, Síndrome de Peutz-Jeghers e Síndrome do Câncer Gástrico Difuso Hereditário (HDGC) (APOSTOLOU e FOSTIRA 2013).

A HBOC está associada com mutações germinativas nos genes *BRCA1* e *BRCA2*. Uma meta-análise estimou em 65% e 45% o risco de desenvolver câncer de mama até os 70 anos para pacientes portadores de mutações em *BRCA1* e *BRCA2*, respectivamente (ANTONIOU et al. 2003). O risco de desenvolver câncer de ovário até essa idade também foi maior em pacientes com mutações em *BRCA1* do que em *BRCA2* (39% e 11%, respectivamente). Um exemplo típico da sobreposição fenotípica que pode ocorrer entre a LFL e a HBOC é representado pelo estudo de SILVA et al. (2012a) que encontrou uma deleção de 36,4 Kb no gene *BRCA1*, englobando os éxons 9-19, em uma paciente com câncer de mama e diagnóstico clínico consistente com LFS/LFL.

A Síndrome de Cowden está relacionada com mutações germinativas no gene *PTEN*. Indivíduos portadores desta Síndrome apresentam um risco de 85% de desenvolver câncer de mama ao longo da vida, além da ocorrência de outros tumores relacionados à LFL/LFS, como o câncer de endométrio (TAN et al. 2012). A

Síndrome de Peutz-Jeghers é ocasionada por mutações germinativas em *STK11* e confere um risco de 85% de desenvolver qualquer câncer até os 70 anos, especificamente de 31% para o câncer de mama até os 60 anos (HEARLE et al. 2006).

A presença de casos de câncer gástrico difuso associado ao câncer lobular da mama pode levantar a suspeita da HDGC, causado pela mutação germinativa no gene *CDHI* (GRAZIANO et al. 2003). Nesta síndrome, o risco acumulativo de desenvolver câncer lobular de mama em mulheres é de aproximadamente 50% (KANGELARIS e GRUBER 2007). Em uma família portuguesa com critérios clínicos incompletos para o diagnóstico da HDGC não foi detectada mutação no gene *CDHI* e sim mutação germinativa no gene *TP53* (OLIVEIRA et al. 2004). KIM et al. (2004) relataram a presença de uma mutação germinativa no gene *TP53* em uma família previamente descrita como portadora da HDGC.

Outra SPHC que também apresenta fenótipo que pode se sobrepor com a LFL/LFS é a Síndrome de Lynch. Esta doença está associada com mutações germinativas nos genes de reparo a erros de pareamento, incluindo *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* e *PMS2* (WEISSMAN et al. 2011). Pacientes com esta síndrome apresentam um risco de 80% de desenvolver tumores colorretais ao longo da vida, porém, também podem desenvolver tumores do espectro fenotípico da LFL/LFS, como carcinomas de cérebro, estômago, ovário, e endométrio (LYNCH 1994; LYNCH e DE LA CHAPELLE 2003). Em adição, dois estudos brasileiros mostraram que o câncer de mama era o tumor extra-colônico mais comuns em mulheres com a Síndrome de Lynch (OLIVEIRA-FERREIRA et al. 2004; DA SILVA et al. 2010).

Estes achados indicam que em casos de história de câncer familiar e a

presença de cânceres múltiplos há a necessidade de estabelecer o diagnóstico preciso para melhor entender e acompanhar os pacientes e suas famílias (MESTER et al. 2013).

1.5 VARIACÕES DO NÚMERO DE CÓPIAS DE DNA (CNV)

As alterações genômicas mais comuns no genoma humano são os SNPs, CNVs (do inglês, *copy number variation*), VNTRs (*variable number of tandem repeats*) e a presença ou ausência de elementos de transição (XU et al. 2011).

As CNVs são alterações estruturais do DNA que podem envolver fragmentos variando de um kilobase (Kb) a vários megabases (Mb) e ocorrem como evento *de novo* ou são herdadas (REDON et al. 2006; BECKMANN et al. 2007; OSTROVNAYA et al. 2010; STANKIEWICZ e LUPSKI 2010). Estima-se que as CNV cobrem aproximadamente 13% do genoma humano (STANKIEWICZ e LUPSKI 2010). As CNVs englobam mais nucleotídeos por genoma do que os SNPs e contribuem significativamente para a diversidade genética e fenotípica entre indivíduos normais (REDON et al. 2006; XU et al. 2011; VEERAPPA et al. 2013).

As CNVs podem ser classificadas em comuns e raras. As CNVs raras são encontradas em menos de 1% da população e podem agir como fatores de suscetibilidade para muitas doenças crônico-degenerativas, a exemplo do diabetes, obesidade, doenças autoimunes e doenças neurológicas (CIRULLI e GOLDSTEIN 2010; KUIPER et al. 2010; NISHIYAMA et al. 2011; MILLS et al. 2011; RAYCHAUDHURI 2011; XU et al. 2011). A patogenicidade das CNVs é determinada levando-se em consideração vários critérios, como o tamanho, tipo

(ganho ou perda), conteúdo gênico, padrão de herança e a presença/frequência em indivíduos normais ou com fenótipos similares aos estudados (VULTO-VAN et al. 2013).

Dados do *Cancer Gene Census* mostraram que 128 genes associados com predisposição ao câncer estão alterados por mecanismos de perda (deleções) ou ganho (inserções ou duplicações) de cópias do DNA (<http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/census/>). Desta forma, as CNVs podem alterar a dosagem gênica de importantes genes supressores tumorais e/ou oncogenes, levando ao desenvolvimento de neoplasias e ainda interferir na resposta ao tratamento (ESTIVILL e ARMENGOL 2007; DISKIN et al. 2009; XU et al. 2011).

Um dos primeiros estudos que avaliou CNVs em pacientes com a LFS revelou que portadores de mutações em *TP53* apresentam um número estatisticamente maior de CNVs quando comparados aos pacientes com *TP53* selvagem (SHLIEN et al. 2008). TABORI et al. (2010) avaliaram o perfil de CNVs em amostras de sangue (19 casos) e tumores (36 casos) de pacientes LFL com carcinomas e papilomas do plexo coróide e mostraram que os carcinomas apresentam um número consideravelmente maior de CNVs se comparados com os papilomas, assim como os carcinomas com mutação em *TP53* também apresentam um número extremamente alto de CNVs quando comparados aos carcinomas com *TP53* selvagem. Além disso, os autores concluíram que uma maior instabilidade genômica (aumento de CNVs) observada nos tumores está associada com um maior risco de progressão neoplásica.

Alguns estudos brasileiros também avaliaram o perfil de alterações genômicas em pacientes com LFS/LFL. No primeiro estudo, SILVA et al. (2012a) utilizaram *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA) para avaliar os genes *BRCA1*, *BRCA2* e *TP53* em 23 pacientes com câncer de mama e diagnóstico clínico consistente com LFS/LFL. Embora nenhuma CNV tenha sido detectada nos genes *BRCA2* e *TP53*, uma paciente apresentou uma deleção no gene *BRCA1*. Num segundo estudo, os mesmos autores (SILVA et al. 2012b) compararam o perfil de CNVs entre pacientes com mutações em *TP53* e um grupo controle composto por 100 indivíduos saudáveis da população brasileira. Foi observado um aumento significativo do número de CNVs raras nos pacientes portadores de mutação, sugerindo que o padrão de alteração genômica pode contribuir para a antecipação e severidade da síndrome.

Recentemente, AURY-LANDAS et al. (2013) utilizaram uma plataforma de microarranjos customizada (com mais sondas cobrindo o *TP53* e os genes e microRNAs associados à sua via) para avaliar as CNVs de 64 pacientes LFL (critérios de Chompret) sem mutações germinativas no *TP53*. Os autores detectaram 20 novas alterações genômicas (oito deleções e 12 duplicações) em 15 pacientes, não descritas previamente no *Database of Genomic Variants* (DGV, "<http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>") e em 600 casos controles. Quatro pacientes que desenvolveram tumores cerebrais apresentaram CNVs englobando quatro genes (*KDM1A*, *MTA3*, *TRRAP* e *SIRT3*) associados com o empacotamento e remodelamento da cromatina. A duplicação da região do gene *SIRT3* promove o aumento de expressão da proteína, assim como a capacidade de proliferação celular e

previne a apoptose, sugerindo que este gene está potencialmente associado a predisposição ao câncer nestas famílias.

1.6 REGIÕES DE HOMOZIGOSE SEM VARIAÇÃO NO NÚMERO DE CÓPIAS - cnLOH

Recentemente, o desenvolvimento de plataformas de *array* com sondas polimórficas e não-polimórficas (SNP-*arrays*) permitiram avaliar CNVs e cnLOHs (*copy neutral loss of heterozigosity*) em um único experimento (MASON-SUARES et al. 2013). As cnLOHs; ou regiões do genoma com perda de heterozigose, mas sem variação do número de cópias, podem ser resultado de diferentes fenômenos: autozigose ou segmentos de DNA idênticos por descendência (quando duas cópias de uma região, herdadas de cada progenitor, são iguais devido a consanguinidade), unidissomia parental (UPD) (quando os dois alelos são herdados de um único progenitor) ou ser um evento adquirido pelo tumor (quando a perda de um alelo é compensado pela duplicação do outro alelo) (KRYH et al. 2011).

Estudos moleculares revelaram que as cnLOHs podem ocorrer em quase todos os cromossomos, porém, a sua localização não é aleatória, uma vez que tendem a se associar com determinadas mutações. Um exemplo descrito em literatura é o das leucemias mielóides agudas, onde foi detectado que todas as cnLOHs do cromossomo 13q englobam mutações em *FLT3*, assim como as cnLOHs do cromossomo 11p apresentam mutações em *WT1* (GRAND et al. 2009; BULLINGER et al. 2010; LAPUNZINA e MONK 2011).

No câncer, as cnLOHs podem inativar genes supressores tumorais ou ativar oncogenes, além de propiciar a perda de *imprinting* de determinados genes, como ocorre nas síndromes de Prader-Willi e Angelman (LAPUNZINA e MONK 2011).

As cnLOHs são frequentemente encontradas em neoplasias hematológicas, assim como em alguns tumores sólidos, representando 50-70% de todos os eventos de LOH detectados em tumores humanos (BIGNELL et al. 2004; TUNA et al. 2009; O'KEEFE et al. 2010). Estudos recentes demonstraram que no câncer colorretal (CCR), ocorre um aumento de cnLOHs tanto em tumores esporádicos como em tumores familiares. MELCHER et al. (2011) analisaram 32 casos esporádicos de CCR (16 com instabilidade de microssatélites-MSI e 16 com estabilidade de microssatélites-MSS) e encontraram várias cnLOHs, principalmente nos tumores MSI. Estes dados sugeriram que esta alteração tem importância no processo tumoral. Por outro lado, um estudo com 30 tumores colorretais familiares (sem mutações nos genes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* e *PMS2*) revelou um aumento de cnLOHs (32%) e uma redução de perdas genômicas (31%) se comparados com casos esporádicos, nos quais foram detectados 55% de perdas genômicas e apenas 14% de cnLOHs (LIPS et al. 2008; MIDDELDORP et al. 2012).

Para o nosso conhecimento, não há relatos em literatura que avaliaram cnLOHs em pacientes com a LFS ou LFL. SAEKI et al. (2011) avaliaram 91 tumores primários e 10 linhagens de câncer de esôfago e encontraram uma correlação positiva entre mutações em *TP53* e LOH no *locus* do referido gene utilizando marcadores microssatélites. Além disso, constataram que três linhagens e quatro tumores primários com mutações em *TP53* e LOH, analisados por FISH, não apresentavam variação do número de cópias. Os autores concluíram que as LOH no *locus* do *TP53* podem ser o principal mecanismo para a inativação do alelo intacto nestes carcinomas. Mais recentemente, RONCHI et al. (2013) avaliaram 46 tumores

adrenocorticais (22 carcinomas e 24 adenomas) e relataram um número muito maior de CNVs nos carcinomas (2631) se comparado com os adenomas (94). Do mesmo modo, 91% dos carcinomas apresentaram cnLOHs em comparação com 29% dos adenomas. Dados em literatura indicam que as CNVs podem ter um papel funcional em diferentes tumores humanos e podem revelar genes associados com o risco de desenvolvimento de tumores múltiplos em indivíduos com história familiar de câncer e negativos para mutações em genes conhecidos como associados a síndromes hereditárias.

2 JUSTIFICATIVA

O diagnóstico molecular da LFL tem importantes implicações clínicas no acompanhamento de indivíduos em risco de desenvolver múltiplos tumores em idade precoce. Estudos moleculares em pacientes com a LFL sem mutações no gene *TP53* e com múltiplos tumores primários são, para o nosso conhecimento, inexistentes. Igualmente, há um número muito limitado de pacientes descritos em literatura com tumores primários múltiplos e história de câncer familiar. A investigação molecular nestes pacientes poderá contribuir para melhorar a nossa compreensão dos mecanismos genéticos envolvidos neste grupo de casos. A identificação de novas alterações genômicas nesses indivíduos será de fundamental importância, pois poderá auxiliar na definição de critérios para a definição de protocolos de rastreamento e acompanhamento clínico para o paciente afetado e seus familiares.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Identificar alterações genômicas raras e novas raras que teriam potencial para contribuir para o fenótipo de pacientes portadores da Síndrome de Li Fraumeni *Like* e pacientes com múltiplos tumores primários previamente rastreados e negativos para mutações germinativas no gene *TP53*

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar a presença de alterações genômicas em pacientes com a síndrome de Li-Fraumeni *Like* que são portadores de múltiplos tumores primários e comparar os achados entre o grupo de pacientes;
- Identificar a presença de alterações genômicas em pacientes com múltiplos tumores primários que não se enquadram nos critérios clássicos das síndromes hereditárias de câncer e comparar os achados entre os pacientes;
- Comparar as alterações genômicas raras e novas raras encontradas nos dois grupos de pacientes para identificar aquelas com potencial para contribuir para o fenótipo;
- Avaliar os familiares de casos particulares para identificar se as alterações investigadas se segregaram nas famílias;

- Sequenciar os genes *BRCA1* e *BRCA2* em membros de famílias específicas que poderiam explicar a presença de casos com câncer de mama;
- Investigar a função dos genes envolvidos com as alterações genômicas raras e novas raras e verificar seu papel no processo da carcinogênese.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

No presente estudo foram selecionadas 27 pacientes portadoras de múltiplos tumores previamente investigadas para mutações no gene *TP53* (CANAVAM et al. 2011; GIACOMAZZI et al. 2012). No estudo de CANAVAM et al. (2011) foram avaliadas 54 pacientes com tumores múltiplos, destas sete apresentaram mutações no gene *TP53*. GIACOMAZZI et al. (2012) selecionaram 54 mulheres portadoras de câncer de mama sem os critérios internacionalmente adotados da LFS/LFL, duas delas foram portadoras de mutação em *TP53*. Deste conjunto amostral, foram selecionadas 27 pacientes que preenchiam os critérios de inclusão do presente estudo. Além disso, quatro familiares oriundos de duas famílias e que não desenvolveram tumores ao longo deste estudo foram também investigados para alterações genômicas. Os casos selecionados e a informação clínica dos pacientes foram obtidos com a colaboração da Dra. Maria Isabel Waddington Achatz (Serviço de Oncogenética do A.C.Camargo Cancer Center - SP) (19 casos) e Dra. Patrícia Ashton-Prolla (Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre - RS) (8 casos). Todos os participantes deste estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do A.C.Camargo Cancer Center (CEP N° 1726112) e do Hospital de Clínicas de Porto Alegre - RS (CEPs N° 08-022 e N° 08-080).

Entre os 27 casos selecionados para o estudo, 15 pacientes com múltiplos tumores primários apresentaram diagnóstico clínico da síndrome Li-Fraumeni *Like* (LFL) e preenchem os critérios de Chompret, Birch ou Eeles. Doze outros casos foram selecionados por apresentarem múltiplos tumores primários (MT) e, embora não preenchessem completamente os critérios estabelecidos para síndromes hereditárias de câncer, eram provenientes de famílias com história de câncer, exceto um caso (MT-10). Todos os casos foram previamente rastreados pelo sequenciamento direto de Sanger nos referidos Serviços (CANAVAM et al. 2011 em SP e GIACOMAZZI et al. 2012 em RS) e resultaram negativos para mutações germinativas patogênicas no *TP53*.

Dez mL de sangue periférico de cada indivíduo foram coletados para a extração do DNA. Nos casos em que os pacientes foram tratados por quimioterapia ou radioterapia a coleta foi realizada um ano, no mínimo, após o tratamento. As informações clínicas e patológicas de cada paciente, incluindo sexo, tumor primário, idade ao diagnóstico, tratamentos realizados e história de câncer familiar estão resumidas nos Quadros 2 e 3.

A idade média para o aparecimento do primeiro tumor primário no grupo de pacientes LFL foi de 36,9 anos e nas pacientes MT foi de 34,6 anos. A maioria dos pacientes era do sexo feminino (21 casos). Quatorze indivíduos apresentaram dois tumores primários, 11 apresentaram três tumores primários e dois apresentaram quatro tumores primários. Os tipos tumorais mais frequentes nestes pacientes foram: carcinoma de mama (10 casos), sarcoma de partes moles (8 casos), carcinoma de tireóide (7 casos) e melanoma maligno (5 casos).

Vinte pacientes realizaram quimioterapia e/ou radioterapia para tratar um ou mais tumores primários. Entre os 13 pacientes que realizaram radioterapia, 11 (seis LFL e cinco MT) desenvolveram outros tumores primários após este tratamento. Entretanto, apenas três casos (LFL-4, LFL-5 e MT-12) apresentaram tumores primários coincidentes com áreas previamente irradiadas. Dois pacientes (MT-11 e MT-14) foram a óbito pela doença ao longo do seguimento clínico desta casuística.

Quadro 2 - Descrição clínica dos 15 pacientes portadores da Síndrome de Li-Fraumeni *like*.

Caso	Gênero	Critério (LFL)	Tumores múltiplos (sítio anatômico, idade e tratamento)				História familiar* (idade)	Seguimento atual (Dezembro/2013)
			1º Tumor	2º tumor	3º tumor	4º tumor		
LFL-1	M	Chompret	CCR (69a) Cirurgia/QT	ADR (71a) Cirurgia	-	-	Tio paterno- CA cabeça e pescoço (80a) Sobrinha-CA tireoide (22a) Tio paterno-CA gástrico (80a)	10 anos e 8 meses. Atualmente, acompanhamento controle (fora do AC Camargo Cancer Center) (em uso de medicamento para diabetes), data da última consulta: 21/08/2013.
LFL-2	F	Chompret	SPM (membro inferior E) (58a) Cirurgia/RT	Pulmão (60a) Cirurgia	Adenoma de suprarrenal (70a) Cirurgia	-	Pai-CCR (77a)	10 anos e 9 meses. Atualmente, acompanhamento controle (AC Camargo Cancer Center) (em 05/2012 diagnosticada com lesão cística em pâncreas), data da última consulta: 29/07/2013.
LFL-3	F	Eeles1	Cólon Uterino (33a) Cirurgia	Mama E (60a) Cirurgia/QT	Tireóide (61a) Cirurgia	-	Pai-CA próstata (77a) Mãe-CA pulmão (69a) Avó materna-Ca colo do útero (69a) Tio materno-CA gástrico (87a) Tia paterna-CA mama (77a) Avó materna- CA pulmão (69a) Irmão-CA próstata (59a)	39 anos. Atualmente, acompanhamento controle (AC Camargo Cancer Center) (em uso de Depura), data da última consulta: 22/08/2013.
LFL-4	F	Eeles2	SPM (Rabdomiossarcoma) (13a) (membro inferior D) Cirurgia/QT/RT	Mama E (36a) QT/ RT	Mama E (38a) Cirurgia (recidiva)	-	Sem história familiar	27 anos e 9 meses. Atualmente, acompanhamento controle (AC Camargo Cancer Center), data da última consulta: 29/08/2013.
LFL-5	M	Eeles2	Retinoblastoma (1a) Cirurgia/QT/RT	Retinoblasto ma bilateral (3a) Cirurgia/QT/ RT	SO (membro inferior D) (23a) Cirurgia/QT	SPM (região de bolsa escrotal) (31a) Cirurgia	Avó materna-CA pulmão (48a) Tia materna de 2º grau-CCR (50a) Prima materna de 3º grau-SNC (23a) Avô paterno-CA gástrico	13 anos e 8 meses. Atualmente, acompanhamento controle (AC Camargo Cancer Center), data da última consulta: 14/06/2013.

Cont/ Quadro 2

Caso	Gênero	Critério (LFL)	Tumores múltiplos (sítio anatômico, idade e tratamento)				História familiar* (idade)	Seguimento atual (Dezembro/2013)
			1º Tumor	2º tumor	3º tumor	4º tumor		
LFL-6	F	Eeles1	SPM (Fibrossarcoma) (ombro direito) (7a) Cirurgia/QT/RT	Tireóide (31a) RT	-	-	Tia materna-CA mama (40a) Prima materna-CA pulmão (56a) Tia paterna-CA mama (45a)	31 anos e 5 meses. Atualmente, acompanhamento controle (AC Camargo Cancer Center) (em uso de medicamento para reposição hormonal/ em 12/2012 diagnosticada com nódulo em mama direita), data da última consulta: 28/10/2013.
LFL-7	F	Eeles1	SPM(Dermatofibrossarcoma) (região submentoniana) (33a) Cirurgia	Linfoma NH (33a) QT/RT	-	-	Pai-Leucemia (66a) Tio paterno-SNC (63a) Avô paterno- LNH (79a) Avô materna-LNH (83a) Tia materna-CA útero (62a)	2 anos e 10 meses. Atualmente, acompanhamento controle (AC Camargo Cancer Center), data da última consulta: 09/10/2013.
LFL-8	F	Eeles1	Tireóide (29a) Cirurgia	SPM (flanco direito) (35a) Cirurgia	-	-	Pai-CA próstata (86a) Tia materna-CA endométrio (42a) Prima materna-CA mama (38a) Avô materno-CA gástrico (71a)	26 anos e 9 meses. Atualmente, acompanhamento controle (AC Camargo Cancer Center) (em uso de medicamento para reposição hormonal/ em 19/10/2013 paciente refere corda vocal paralisada), data da última consulta: 25/07/2013.
LFL-9	F	Chompret	Melanoma (abdome) (29a) Cirurgia	Mama D (38a) Cirurgia	-	-	Avô paterno-CCR (80a) Avô paterna-CA melanoma (74a) Pai-CA renal (58a) Mãe-CA mama (48a) Irmã-CA mama (36a) Sobrinho-SNC (5a) Tia materna-CA mama (33a) Prima materna-CA mama (36a) Prima materna -CA mama (38a)	15 anos e 6 meses. Atualmente, acompanhamento controle (AC Camargo Cancer Center) (em uso de Tamoxifeno/ em 22/07/2013 diagnosticada com neoplasia benigna hepática), data da última consulta: 22/07/2013.

Cont/ Quadro 2

Caso	Gênero	Critério (LFL)	Tumores múltiplos (sítio anatômico, idade e tratamento)				História familiar* (idade)	Seguimento atual (Dezembro/2013)
			1º Tumor	2º tumor	3º tumor	4º tumor		
LFL-10	F	Eeles 1	Mama D (48a) Cirurgia	Endométrio (49a) Cirurgia	-	-	Mãe-CA útero (62a) Pai-CA próstata Tios paternos-CA próstata Tio materno-CA próstata Tio materno-CA estômago Prima materna-CA pâncreas Primo materno- CA indeterminado (63a) Primo materno-CA pulmão (50a) Primo materno 2º grau-CA SNC (40a)	8 anos. Acompanhamento controle HC de Porto Alegre com equipe da Oncogenética, data da última consulta: 25/08/2010.
LFL-11	F	Eeles 1	Colo Uterino (41a) Cirurgia/QT	Pancreás (51a) Cirurgia	-	-	Avó materna -CA tireóide/ SNC (50a) Prima materna-Leucemia (48a) Prima materna-CA útero (25a) Prima materna-LH	7 anos. Acompanhamento controle HC de Porto Alegre com equipe da Urologia, Cirurgia do aparelho digestivo e Oncogenética, data da última consulta: 23/07/2013.
LFL-12	F	Eeles 1	Mama D (42a) Cirurgia	Tireóide (44a) Cirurgia	-	-	Avô paterno-CA próstata (60a) Tio materno-CA pulmão (65a) Tio materno-CA garganta (50a)	11 anos e 11 meses. Acompanhamento controle HC de Porto Alegre com equipe da Oncogenética, data da última consulta: 11/03/2009.
LFL-13	M	Eeles 1	Linfoma NH (50a) QT/RT	Rim (52a) Cirurgia	CCR (56a) Cirurgia	-	Pai-CA esôfago Sobrinho-Leucemia	8 anos e 5 meses. Acompanhamento controle HC de Porto Alegre com equipe da Urologia, Oncologia, e Oncogenética, data da última consulta: 06/11/2013.
LFL-14	F	Chompret	CEC (Língua) (73a) Cirurgia	Tireóide (74a) RIT	Endométrio (77a) BRT	-	Irmão-CA próstata (78a) Filha-CA mama bilateral (58a, 64a) Sobrinha-CA mama bilateral (54a, 57a) Neta-Leucemia (16a)	14 anos e 5 meses. Atualmente, acompanhamento controle (AC Camargo Cancer Center) (em uso de medicamento para hipertensão), data da última consulta: 07/10/2013.

Cont/ Quadro 2

Caso	Gênero	Critério (LFL)	Tumores múltiplos (sítio anatômico, idade e tratamento)				História familiar* (idade)	Seguimento atual (Dezembro/2013)
			1º Tumor	2º tumor	3º tumor	4º tumor		
LFL-15	F	Chompret	Melanoma (28a) (membro superior direito) Cirurgia	Melanoma (30a) (membro superior direito - recidiva) Cirurgia	Melanoma (35a) (atrás da orelha esquerda) Cirurgia	-	Irmão-CA SNC (40a) Mãe-SO (28a), (35a), (39a) Pai-CA melanoma (59a)/CA não-melanoma (60a) Avô paterno-CCR (70a) Primo paterno-CA hipófise (25a) Primo paterno 2º grau-CA hipófise (13a) Tia materna-CCR (52a) Tia paterna-CCR (53a) Tio materno-melanoma (42a) Primo materno-osteossarcoma (18a) Prima materna-melanoma (18a) Avó materna-CA mama (70a) Tia materna 2º grau-SO (35a) Tia materna 2º grau-CCR (62a) Tio materno 2º grau-CA próstata (41a) Bisavó paterna-CCR (68a) Bisavó materna-CA gástrico (80a)	25 anos e 8 meses. Atualmente, acompanhamento controle (AC Camargo Cancer Center), data da última consulta: 28/12/2013.

Legenda: ADR: adrenocortical; RT: radioterapia; QT: quimioterapia; RIT: radioiodoterapia; BRT: braquiterapia; CA: câncer; CCR: câncer colorretal; SO: sarcoma ósseo; SPM: sarcomas de partes moles; CEC: carcinoma epidermóide; SNC: sistema nervoso central; LH: Linfoma Hodgkin; LNH: Linfoma não Hodgkin;

*Os antecedentes familiares de cada paciente estão compilados nos heredogramas

(-) ausência da característica

Quadro 3 - Descrição clínica dos 12 pacientes portadores de múltiplos tumores (MT).

Caso	Gênero	Tumores múltiplos (sítio anatômico, idade e tratamento)				História familiar* (idade)	Seguimento atual (Dezembro de 2013)
		1º Tumor	2º tumor	3º tumor	4º tumor		
MT-1	M	Intestino delgado (39a) Cirurgia	CCR (40a) Cirurgia	CEC (região do tórax) (41a) Cirurgia	-	Mãe-CCR (44a) Avô paterno-CA próstata Irmã-CCR (23a) Irmã-melanoma (67a) Irmão-CCR (45a) Irmão- melanoma (48a) Irmão-CA gástrico (41a)	15 anos e 6 meses. Atualmente, acompanhamento controle (AC Camargo Cancer Center) (em uso de medicamento para hipertensão), data da última consulta: 24/09/2013.
MT-2	F	Mama D (ductal in situ) (58a) Cirurgia/QT	Linfoma NH (61a) QT/RT	CEC (lábio) (65a) QT	CA órbita ocular (69a) Cirurgia	Mãe-CCR (74a) Pai-CA cabeça e pescoço (60a) Tia paterna-Leucemia (60a) Tio paterno-CA pulmão (62a) Tia materna-CA cabeça e pescoço (62a) Tia materna-CA mama (55a) Primo materno-Leucemia (53a) Prima paterna-CA mama (62a) Avô materno-CA indeterminado (56a)	8 anos e 3 meses. Atualmente, acompanhamento controle (AC Camargo Cancer Center) (em uso de medicamento para fins psicológicos), data da última consulta: 25/10/2013.
MT-3	F	Melanoma (abdome) (40a) Cirurgia	Mama D (43a) Cirurgia	Bexiga (47a) Cirurgia/QT	-	Mãe-CCR (67a) Tio materno-CA basocelular (81a) Tia materna-CA mama (68a), CA gástrico (79a) e melanoma (79a) 3 Primas materna-CA mama (54a), (48a), (43a) Tia paterna-CA mama (50a) e melanoma (72a) Primo paterno-CA pulmão (41a) Prima materna-CA Tireóide (51a)	6 anos e 7 meses. Atualmente, acompanhamento controle (AC Camargo Cancer Center), data da última consulta: 10/10/2013.

Cont/ Quadro 3

Caso	Gênero	Tumores múltiplos (sítio anatômico, idade e tratamento)				História familiar* (idade)	Seguimento atual (Dezembro de 2013)
		1º Tumor	2º tumor	3º tumor	4º tumor		
MT-4	F	Melanoma (pé esquerdo) (42a) Cirurgia	Mama E (ductal invasivo) (43a) QT/RT	-	-	Irmã-CA mama (42a) Tia paterna-CA mama (43a)	8 anos e 6 meses. Atualmente, acompanhamento controle (AC Camargo Cancer Center), data da última consulta: 20/07/2013.
MT-6	F	Linfoma H (21a) cirurgia/QT/RT (RT em região do pescoço, tórax e abdômen)	Mama D (52a) (ductal invasivo) Cirurgia	Mama E (52a) (ductal invasivo) Cirurgia	-	Tio paterno- CA cabeça e pescoço (35a) Tio paterno-CA cabeça e pescoço (70a) Primo paterno-SPM (12a) Avô paterno-CA gástrico (64a)	3 anos e 3 meses. Atualmente, acompanhamento controle (AC Camargo Cancer Center) (em uso do medicamento Aromasin), data da última consulta: 03/10/2013.
MT-7	F	Tireóide (41a) Cirurgia	Pulmão (43a) Cirurgia	-	-	Tia paterno-CCR (50) Prima paterna-CA mama (22a)	10 anos e 10 meses. Atualmente, acompanhamento controle (AC Camargo Cancer Center) (em uso de medicamento para reposição hormonal), data da última consulta: 21/10/2013.
MT-8	F	Mama D (48a) Cirurgia/QT/RT	Tireóide (52a) RT	Mama E (60a) QT/RT	-	Irmã-CA renal (71) Irmã-CA tireóide (48) Tia paterna-CA mama (70)	11 anos e 3 meses. Atualmente, acompanhamento controle (AC Camargo Cancer Center) (em uso do medicamento Anastrozol), data da última consulta: 26/05/2012.
MT-11	M	Melanoma (cervical) (67a) Cirurgia	SPM (retroperitônio) (67a) Cirurgia	CA Gástrico (73a) Cirurgia/QT	-	Sem história familiar	Paciente foi a óbito em 03/2011.
MT-12	F	Retinoblastoma bilateral (2a) Cirurgia/QT/RT	SPM (Rabdomiosarcoma de face) (11a) RT	-	-	Tio materno 2º grau-CA cavidade oral Bisavô materno-CA indeterminado	20 anos. Acompanhamento controle HC de Porto Alegre com equipe da oftalmologia e da Oncologia Pediátrica, data da última consulta: 22/03/2013.

Cont/ Quadro 3

Caso	Gênero	Tumores múltiplos (sítio anatômico, idade e tratamento)				História familiar* (idade)	Seguimento atual (Dezembro de 2013)
		1º Tumor	2º tumor	3º tumor	4º tumor		
MT-13	M	Tumor Wilms (6a) cirurgia/QT/RT	Schwano ma extramedular (14a) Cirurgia	-	-	Avô paterno-CA pâncreas Avô materno-CA estômago Avó materna-CA indeterminado (81a) Tios maternos 2º grau-CA indeterminado Tio materno 2º grau-CA pulmão Tio materno 2º grau-CA esôfago	18 anos e 9 meses. Acompanhamento controle HC de Porto Alegre com equipe da Urologia e da Oncologia pediátrica, data da última consulta: 14/11/2013.
MT-14	F	Leucemia Linfóide aguda (13a) QT	CCR (15a) Cirurgia/QT	-	-	Tia paterna 2º grau-CCR (45a) Bisavô paterno-CA esôfago	Paciente foi a óbito.
MT-15	F	Endométrio (38a) Cirurgia/QT	Ovário (42a) Cirurgia	-	-	Filho-CCR (25a) Irmã-CA ovário (41a) Pai-CCR (42a) Tio paterno-CCR (60a) Tia paterna-CCR (60a) Tio paterno-CA próstata (76a) Primo paterno-CCR (40a) Tio materno-CA garganta (40a)	2 anos e 2 meses. Acompanhamento controle HC de Porto Alegre com equipe da Oncogenética, data da última consulta: 28/09/2011.

Legenda: RT: radioterapia; QT: quimioterapia; RIT: radioiodoterapia; BRT: braquiterapia; CA: câncer; CCR: câncer colorretal; SPM: sarcoma de partes moles; CEC: carcinoma epidermóide; SNC: sistema nervoso central; LH: Linfoma Hodgkin; LNH: Linfoma não Hodgkin;

*Os antecedentes familiares de cada paciente estão compilados nas genealogias

(-) ausência da característica

4.2 OBTENÇÃO DO DNA GENÔMICO (gDNA)

As amostras de gDNA foram obtidas a partir de linfócitos do sangue periférico dos pacientes junto ao Banco de Macromoléculas do A.C. Camargo Cancer Center, seguindo o protocolo *Gentra Puregene Blood Kit* (Qiagen, Valencia, CA, EUA). A separação dos linfócitos por tampão de extração tem como produto final um *buffycoat*, ao qual foram adicionados 600 μ L da solução de lise celular (*Cell Lysis Solution*). Os tubos foram agitados em vórtex e mantidos em banho-Maria a 55°C até a completa digestão celular. Em seguida foram adicionados 140 μ L de *Protein Precipitation Solution* e após agitação vigorosa por 20 segundos, incubou-se em gelo por 5 a 15 min e centrifugou-se a 14000 rpm por 5 min a 18°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e foram adicionados 600 μ L de isopropanol 100%. As amostras foram homogeneizadas por inversão e centrifugadas a 14000 rpm por 30 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado, 1 mL de etanol 70% foi adicionado, seguindo-se a homogeneização por inversão e centrifugação a 14000 rpm por 2 min a 4°C. Novamente o sobrenadante foi descartado e o processo de lavagem em etanol foi repetido uma vez mais. Após a retirada do sobrenadante, o sedimento foi mantido a 42°C por alguns minutos e adicionados às amostras 100 μ L de *DNA Hydration Solution*.

Os tubos foram mantidos a 55°C para a completa eluição do sedimento e a quantificação foi realizada em gel de agarose 0,8%. Por último, as amostras foram armazenadas a -20°C até a realização dos experimentos.

4.3 DETECÇÃO DE ALTERAÇÕES GENÔMICAS (SNPs e CNVs)

O perfil de alterações genômicas foi avaliado utilizando-se a metodologia de *CytoScan HD Array* (Affymetrix, Santa Clara, CA, EUA). Esta plataforma de microarranjos de alta densidade apresenta mais de 2,6 milhões de sondas, incluindo 1,9 milhões de sondas não-polimórficas (para avaliar as CNVs) e 750 mil sondas polimórficas ou de SNPs (para determinação alélica). O espaçamento médio entre cada sonda é 2 Kb e há uma sonda a cada 400 pares de base em regiões alvo. O espaçamento médio das sondas de SNPs é de 200 por megabase. As sondas tem um tamanho de 25 pares de bases. Aproximadamente 90% dos SNPs tem uma frequência do alelo raro de 0,05 baseados em dados do projeto 1000 Genomas (<http://www.1000genomes.org>).

A plataforma usada neste estudo permite detectar ganhos e perdas genômicas a partir de 25-50 kb e corroborar os resultados com os dados de SNPs. Adicionalmente, as sondas de SNPs também permitem a detecção de regiões com mosaicismos e regiões de cnLOH.

Todos os ensaios foram realizados de acordo com o protocolo padrão do fabricante (Figura 1). Resumidamente, 250 ng do gDNA foi digerido com a enzima de restrição NspI, ligado a adaptadores específicos, amplificado pela PCR com a enzima Titanium Taq DNA polimerase (Clontech, Mountain View, CA, USA) e visualizado em gel de agarose 2% (fragmentos entre 150 e 2000 pb). O material amplificado foi purificado utilizando-se *beads* magnéticas e quantificado em NanoDrop® ND1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA). A concentração desejada é superior a 2,5 µg/µl. Posteriormente, o DNA purificado foi

fragmentado com a enzima DNaseI, visualizado em gel de agarose 4% (fragmentos entre 25 e 125 pb) e marcado com biotina. O DNA marcado foi hibridado por 16-18h a 50°C no *GeneChip® Hybridization Oven 645* (Affymetrix), lavado e corado no *GeneChip® Fluidics Station 450* (Affymetrix) e escaneado no *GeneChip® Scanner 3000 7G* (Affymetrix).

Os dados foram gerados utilizando-se o Affymetrix® *GeneChip® Command Console® Software* (AGCC) 4.0 e analisados com o *Chromosome Analysis Suite v2.1* (ChAS) (Affymetrix). Para calcular as CNVs e os genótipos (alelos), os dados de cada paciente foram comparados com um banco de 360 amostras normais previamente analisadas (incluídas no software ChAS). O software utiliza o modelo de Hidden Markov (HMM) e o método linear robusto Bayesiano com distância de Mahalanobis (BRLMM-p) para estimar as CNVs e os genótipos, respectivamente. Regiões com mosaicismos (>5 Mb) foram determinadas utilizando a média dos *log2 ratio*. Regiões com cnLOH foram calculadas com base nas sondas de SNPs e reportadas apenas aquelas com tamanho maior do que 5 Mb. Na análise das CNVs foram considerados os ganhos com o mínimo de 50 sondas consecutivas e as perdas com o mínimo de 25 sondas consecutivas.

As CNVs resultantes foram comparadas individualmente com cinco bancos de dados disponíveis: o *DGV*, que agrega dados de CNVs de pessoas saudáveis obtidas por diversos métodos; um grupo referência de 100 mulheres saudáveis da população brasileira, avaliadas por Krepischi et al. (2012) utilizando a plataforma Agilent 4x180K; um banco de 500 indivíduos saudáveis da população europeia; um banco de 500 indivíduos saudáveis provenientes do *Fullerton Genetics Center* (Nashville, NC, EUA) e um banco de 823 indivíduos saudáveis da população

canadense. As CNVs das três últimas populações foram geradas pela mesma plataforma utilizada neste projeto e os arquivos foram cedidos gentilmente pela Dra. Sarah South, *Department of Pathology, Utah University, EUA*.

Após múltiplas comparações, as CNVs foram classificadas em comuns, raras e novas raras. As CNVs comuns foram assim categorizadas quando presentes em mais de 1% da população dos bancos avaliados, as raras quando encontradas em < 1% nas mesmas populações e as novas raras quando ausentes em todos os bancos de dados pesquisados. Uma CNV foi considerada como previamente descrita somente quando presente em qualquer um dos bancos de dados e com o mesmo tamanho e localização ou quando apresentava um tamanho maior, mas englobando aquela detectada no estudo.

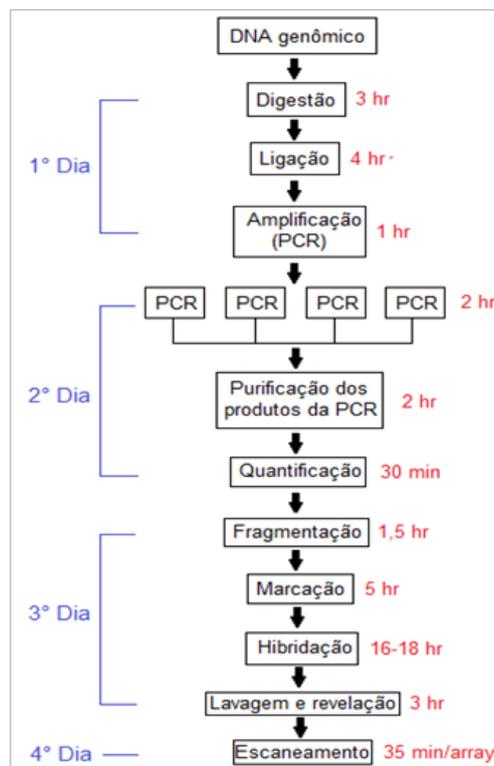


Figura 1 - Etapas do protocolo *CytoScan HD Array*.

4.4 DETECÇÃO DE MUTAÇÕES EM *BRCA1* E *BRCA2* POR SEQUENCIAMENTO DIRETO (SANGER)

Mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* foram investigadas nas pacientes MT-2 e MT-4 que apresentaram carcinomas de mama (ductal *in situ* e ductal invasivo, respectivamente) e história de câncer de mama na família.

A metodologia utilizada foi o sequenciamento direto de Sanger, que consiste na amplificação de todos os éxons e junções intron-exons dos genes *BRCA1* e *BRCA2*, purificação enzimática do amplicon, incorporação dos dNTPs e precipitação dos produtos obtidos. Os iniciadores dos genes *BRCA1* e *BRCA2* foram disponibilizados pelo laboratório de diagnóstico molecular sob supervisão da Dra. Dirce Maria Carraro, AC Camargo Cancer Center, SP. Por se tratar de teste diagnóstico, os iniciadores utilizados no estudo não foram disponibilizados.

Na PCR foram utilizados 0,2 μ M de cada iniciador (*forward* e *reverse*) e 25 ng de gDNA. A concentração de Mg^{2+} variou para alguns exons dos dois genes. Para os éxons 7 e 17 do gene *BRCA1* e éxons 12, 15, 27A e 27B do gene *BRCA2* foi necessário utilizar o Mg^{2+} a 1,25mM. Para os demais éxons o Mg^{2+} foi utilizado a 2mM. As condições da PCR estão descritas no Quadro 4. O volume de 5,0 μ L do produto amplificado foi purificado com 2,0 μ L da enzima Exo-Sap I (USB/GE).

Quadro 4 - Condições da PCR para os genes *BRCA1* e *BRCA2*.

Gene / Exons*	Temperatura de anelamento (TM)	Ciclos da PCR
BRCA 1		94°C-2 min [94°C-45seg; TM-45seg; 72°C-1min,45seg] 35x 72°C-10min 4°C ∞
2, 7	TM=53°C	
3, 5, 6, 8, 9, 10, 11.1.AB, 11.1.CD, 11.1.EF, 11.2.GH, 11.2.IJ, 11.2.LM, 11.3.NO, 11.3.PQ, 11.3.RS, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24	TM=59°C	
BRCA2		
2, 3, 4, 5/6, 7, 8, 9, 10.AB, 10.CF, 11.1.AB, 11.1.CD, 11.1.EF, 11.2.GH, 11.2.IJ, 11.2.LM, 11.3.NO, 11.3.PQ, 11.3.RS, 11.4.TU, 11.4.VX, 11.5YW, 11.5KZ, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23/24, 25, 26, 27A, 27B	TM=59°C	
12	TM=55°C	
13, 22	TM=53°C	

* Por se tratar de teste diagnóstico, os iniciadores utilizados não foram disponibilizados para publicação.

A reação de sequenciamento foi realizada com a adição de 1,5 µL 5x Sequencing Buffer BigDye Terminator v1.1, v3.1, 5 µM do iniciador, 1,0 µL de BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), utilizando-se os pares de iniciadores específicos para cada fragmento amplificado. As condições da reação de sequenciamento foram desnaturação a 95°C por 2 min, seguidos de 40 ciclos a 95°C por 18 seg, 50°C por 18 seg e 60°C por 3 min e 30 seg. As amostras foram ressuspendidas em 13 µL de formamida Hi-Di (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), desnaturadas a 95°C em termociclador por 5 min e imediatamente transferidas para recipiente com gelo por 3min. As reações de sequenciamento foram realizadas no sequenciador *ABI Prism 3130xl* (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA).

As sequências obtidas foram analisadas no *Software CLC Main Workbench* 6.7. Para a identificação das alterações, as sequências dos pacientes foram alinhadas e comparadas com a sequência referência de cada gene, a qual foi obtida utilizando o próprio software *CLC Genomics Workbench*. Para o gene *BRCA1* foi utilizada RefSeq:U14680 como referência e para o gene *BRCA2* foi utilizada RefSeq: U43746. As informações identificadas foram comparadas com o banco de dados BIC (Breast Cancer Information Core - <http://research.nhgri.nih.gov/bic>).

4.5 ANÁLISE CITOGENÉTICA

A análise cariotípica foi realizada na amostra LFL-8 com o objetivo de confirmar a alteração detectada em mosaicismo para o cromossomo X, encontrada na análise genômica. Foram obtidos 5 mL de sangue periférico da paciente, previamente coletado com o anti-coagulante heparina e cultivados em meio de cultura RPMI (*Gibco*, Carlsbad, CA, EUA) com 10% de Soro Bovino Fetal (*Hyclone*, Logan, UT, EUA), 50 µg/mL de penicilina, estraptavidina (0,5%) e fitohemaglutinina (*Sigma*, St. Louis, MO, EUA). A cultura das células foi realizada segundo a metodologia descrita por Moorhead et al. (1960). Após 71 horas, as culturas foram submetidas a tratamento com colchicina 0,0016% por 1 hora. Posteriormente, a preparação foi submetida a tratamento com solução hipotônica KCl 0,075M e fixada com metanol:ácido acético (3:1) por três vezes.

As lâminas com as preparações cromossômicas foram submetidas ao bandamento DAPI-reverso (4',6-diamidino-2-phenylindole) (*Sigma*), obtendo um padrão de bandas semelhante ao bandamento GTG. A técnica usada consiste na

imersão das lâminas em solução seriada de etanol (70%, 90%, 100%) por 3 min cada. Após a secagem, as lâminas foram tratadas em solução de pepsina 10% a 37°C por 10 min, incubadas em solução de 2xSSC (0,3 M de cloreto de sódio (NaCl) e 0,03 M de citrato de sódio (Na₃C₆H₅O₇); pH 7,0) a 37°C por 10 min e lavadas novamente em solução seriada de etanol. Após a secagem, as lâminas foram colocadas rapidamente em solução de formamida a 71°C e lavadas em solução seriada de etanol. Após a secagem, foi adicionado oito µL de DAPI nas regiões com maior número de metáfases. Por último, as lâminas foram mantidas a -20°C por 24h antes da análise cromossômica.

A análise citogenética foi realizada a partir da montagem e elaboração das fórmulas cariotípicas segundo as recomendações do ISCN (2009). Um total de 102 metáfases foram capturadas e analisadas no microscópio *Olympus BX61* conectado a um sistema de análise de imagens *BandView 4.5 Software* (Applied Spectral Imaging, Israel).

5 RESULTADOS

Vinte e sete pacientes negativos para mutações germinativas patogênicas no gene *TP53*, incluindo 15 pacientes portadores da síndrome de Li-Fraumeni *like* e 12 pacientes portadores de múltiplos tumores primários, foram analisados para alterações genômicas utilizando a plataforma *CytoScan HD Array* (Affymetrix). Estes dois grupos de pacientes apresentaram, no total, 525 alterações genômicas. A seguir são descritos os resultados detalhados destes dois grupos de pacientes.

5.1 PACIENTES DIAGNOSTICADOS COM A SÍNDROME DE LI-FRAUMENI *LIKE*

O DNA do sangue periférico dos pacientes diagnosticados como portadores da Síndrome de Li-Fraumeni *like* apresentou, no total, 332 alterações genômicas, sendo 158 ganhos, 119 perdas e 55 cnLOHs. As regiões cromossômicas envolvidas em ganhos apresentaram um tamanho médio de 251 Kb, as regiões de perdas apresentaram em média 249 Kb e as cnLOHs apresentaram um tamanho médio de 12 Mb. Entre os ganhos genômicos, dois (10q26.2 e 17q11.2) foram identificados em mosaïcismo no paciente LFL-8. Entre as perdas genômicas, quatro foram observadas em mosaïcismo também no paciente LFL-8 (7q11.22, 17q23.1, 22q13.1 e Xp22.33-q28). Perdas genômicas em homozigose foram identificadas nos pacientes LFL-1 (4q13.2 e 17p11.2) e LFL-11 (Xp21.3).

As alterações genômicas após comparação com cinco bancos de dados contendo informações sobre variações no número de cópias genômicas em diferentes populações resultando em 110 comuns, 146 raras e 76 novas raras. Todas as seis alterações em mosaico foram raras e apenas uma das três perdas em homozigose (4q13.2 em LFL-1) foi classificada como rara. Apesar de não existir um banco de dados específico de cnLOHs para comparação, todas as 55 alterações foram consideradas raras baseadas no fato de terem sido identificadas em regiões que não apresentavam CNVs comuns. No Quadro 5 encontram-se listados os tipos de CNVs e cnLOHs e sua classificação em comuns, raras e novas raras em todos os pacientes LFL deste estudo.

Quadro 5 - Resumo das alterações genômicas detectadas nos pacientes LFL.

Tipo de alteração	Nova Rara	Rara	Comum	TOTAL
Ganho	38	49	69	156
Ganho em Mosaico	0	2	0	2
Perda (homozigose)	38	36 (1)	41 (2)	115
Perda em Mosaico	0	4	0	4
cnLOH	0	55	0	55
TOTAL	76	146	110	332

Todos os pacientes, exceto o LFL-4, apresentaram CNVs raras e novas raras. A Figura 2 apresenta o número de alterações identificadas em cada um dos 15 pacientes LFL.

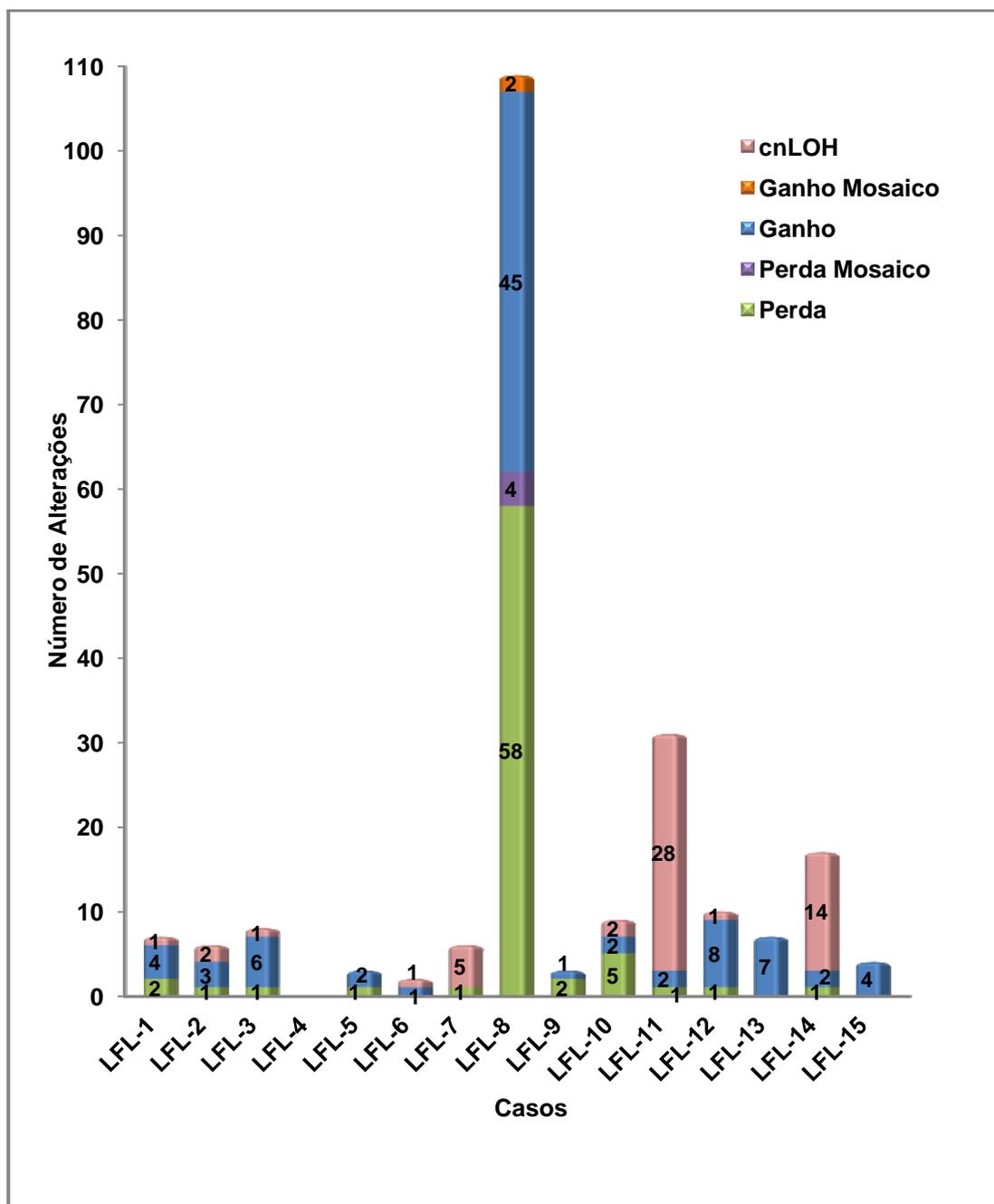


Figura 2 - Número de alterações raras e novas raras encontradas em cada caso no grupo de pacientes com Síndrome de Li-Fraumeni *like*.

Considerando que as CNVs comuns não parecem estar associadas a fenótipos específicos, serão apresentados em detalhes os resultados das 222 alterações raras e novas raras. O Quadro 6 apresenta as CNVs e cnLOHs raras e novas raras encontradas em cada um dos pacientes com LFL.

Quadro 6 - Alterações raras e novas raras encontradas em 14 dos 15 pacientes LFL, assim como o número de genes mapeados em cada região.

Casos	Evento	Citobanda	Início	Fim	Classificação	Nº de Genes**	GENES***
LFL-1							
	Ganho	2p25.3	206002	330912	Rara	3	<i>SH3YLI, ACP1, FAM150B</i>
	Ganho	2q31.1	176928696	177058451	Rara	9	<i>EVX2, HOXD13, HOXD12, MTX2, MIR10B, HOXD4, HOXD3, HOXD1, HOXD-AS1</i>
	Perda	2q34	213158700	213192832	Rara	1	<i>ERBB4</i>
	Perda*	4q13.2	69333761	69584322	Rara	1	<i>TMPRSS11E</i>
	Ganho	10q26.3	134269773	134357433	Rara	1	<i>INPP5A</i>
	cnLOH	11p11.2	46146791	51563636	Rara	54	-
	Ganho	15q26.3	99391363	99405150	Nova rara	1	<i>IGF1R</i>
LFL-2							
	Perda	1p31.2	69049076	69457873	Nova Rara	0	-
	Ganho	1p31.3	65216061	66868169	Rara	11	-
	Ganho	2p25.3	584562	950475	Rara	3	<i>TMEM18, LOC339822, SNTG2</i>
	Ganho	16q24.2	88356426	88974162	Rara	2	<i>ZC3H18, IL17C</i>
	cnLOH	Xq11.1	61932503	67371477	Rara	14	-
	cnLOH	Xq22.3	104232592	109046487	Rara	26	-
LFL-3							
	Perda	5p12	45922107	49447301	Rara	0	-
	Ganho	10q11.22	49739358	50004396	Nova Rara	1	<i>ARHGAP22</i>
	Ganho	18q12.2	34911263	35179808	Rara	1	<i>CELF4</i>
	Ganho	18q22.3	72709254	73193344	Rara	4	<i>ZNF407, ZADH2, TSHZ1, C18orf62</i>
	Ganho	18q23	75449023	76814582	Rara	1	<i>SALL3</i>
	Ganho	21q22.3	47758546	48097372	Rara	5	<i>PCNT, DIP2A, DIP2A-IT1, S100B, PRMT2</i>
	Ganho	22q13.32	48862426	49201108	Rara	2	<i>FAM19A5, LOC284933</i>

	cnLOH	Xq11.1	61932503	67143057	Rara	14	-
LFL-5							
	Ganho	2q31.1	176882120	177169918	Rara	9	<i>EVX2, HOXD13, HOXD12, MTX2, MIR10B, HOXD4, HOXD3, HOXD1, HOXD-AS1</i>
	Ganho	6q25.3	160337557	160597874	Nova Rara	4	<i>IGF2R, AIRN, LOC729603, SLC22A1</i>
	Perda	7p12.1	53415767	53690391	Rara	0	-
LFL-6							
	Ganho	1q25.1	175298592	175554109	Nova Rara	1	<i>TNR</i>
	cnLOH	Xq11.1	61932503	68021816	Rara	18	-
LFL-7							
	cnLOH	2p14	66677880	80456944	Rara	115	-
	Perda	4q13.2	69320820	69628480	Rara	1	<i>TMPRSS11E</i>
	cnLOH	7p14.3	31794780	41516453	Rara	47	-
	cnLOH	Xp11.21	54904044	58337890	Rara	24	-
	cnLOH	Xq11.1	61932503	68045782	Rara	18	-
	cnLOH	Xq22.2	103009034	107407242	Rara	25	-
LFL-8							
	Ganho	1q23.3	165390065	165430053	Rara	1	<i>RXRG</i>
	Ganho	1q32.2	209745073	209799819	Rara	2	<i>LAMB3, CAMK1G</i>
	Ganho	1p22.1	94523848	94575458	Nova Rara	1	<i>ABCA4</i>
	Perda	1q42.11	224331652	224425165	Nova Rara	3	<i>NVL, DEGS1, FBXO28</i>
	Perda	1p31.1	70725639	70811267	Nova Rara	1	<i>ANKRD13C</i>
	Perda	2q21.3	136013756	136214663	Rara	1	<i>ZRANB3</i>
	Perda	2q33.1	203075134	204579113	Rara	15	-
	Perda	2q36.1	224650940	224683581	Nova Rara	1	<i>APIS3</i>
	Perda	2p22.3	32215065	32358488	Nova Rara	3	<i>SPAST, DPY30, MEMO1</i>
	Perda	2p22.2	37164043	37231728	Nova Rara	2	<i>HEATR5B, STRN</i>
	Perda	2p15	61344545	61392125	Nova Rara	3	<i>C2orf74, LOC339803, KIAA1841</i>

	Perda	2p15	61462212	61481551	Nova Rara	1	<i>USP34</i>
	Perda	2p15	61659390	61741760	Nova Rara	2	<i>XPO1, USP34</i>
	Ganho	3p25.1	13691882	13771684	Rara	1	<i>LOC285375</i>
	Ganho	3p24.1	29295162	29357063	Nova Rara	1	<i>RBMS3</i>
	Ganho	3p14.1	64597030	64650662	Nova Rara	1	<i>ADAMTS9</i>
	Ganho	3p13	71074419	71105863	Nova Rara	1	<i>FOXP1</i>
	Perda	3q13.33	120750824	120785729	Nova Rara	1	<i>STXBP5L</i>
	Perda	3q23	141669062	141864714	Rara	1	<i>TFDP2</i>
	Perda	3q27.3	186439172	186454905	Rara	1	<i>KNG1</i>
	Perda	3p21.31	47773919	47818306	Nova Rara	1	<i>SMARCC1</i>
	Perda	3p21.2	51485849	51550011	Nova Rara	1	<i>VPRBP</i>
	Perda	3p14.3	57549343	57635167	Nova Rara	2	<i>FAM116A, ARF4</i>
	Ganho	4q12	52758811	52780639	Nova Rara	1	<i>DCUN1D4</i>
	Ganho	4q21.1	78268640	78327099	Rara	0	-
	Perda	4q28.2	128942969	129018409	Nova Rara	2	<i>LARP1B, C4orf29</i>
	Perda	4q31.3	151858542	152009620	Rara	1	<i>LRBA</i>
	Perda	4p11	48700491	48768196	Rara	1	<i>FRYL</i>
	Perda	4q12	54159843	54270148	Nova Rara	2	<i>FIP1L1, SCFD2</i>
	Perda	4q13.2	69265993	69294114	Rara	0	-
	Ganho	5p15.2	14212404	14279034	Nova Rara	1	<i>TRIO</i>
	Ganho	5p15.31	6355393	6387338	Nova Rara	1	<i>MED10</i>
	Perda	5p13.2	37339834	37424367	Nova Rara	2	<i>WDR70, NUP155</i>
	Ganho	6p25.3	29491	37897	Nova Rara	0	-
	Ganho	6p21.1	43741295	43806470	Nova Rara	1	<i>VEGFA</i>
	Ganho	6p21.1	45447865	45471364	Nova Rara	1	<i>RUNX2</i>
	Ganho	6q15	90784242	90820760	Nova Rara	1	<i>BACH2</i>
	Perda	6q25.1	149849873	149892092	Nova Rara	2	<i>C6orf72, PPIL4</i>
	Perda	6p21.31	34675507	34741922	Nova Rara	1	<i>SNRPC</i>

	Ganho	7q36.2	154633844	154657404	Rara	1	<i>DPP6</i>
	Ganho	7q36.3	155462865	155576626	Nova Rara	1	<i>RBM33</i>
	Ganho	7p14.3	30773973	30869621	Nova Rara	3	<i>INMT-FAM188B, FAM188B, INMT</i>
	Ganho	7p14.3	32063181	32093817	Nova Rara	1	<i>PDE1C</i>
	Ganho	7p12.2	50428038	50469306	Nova Rara	1	<i>IKZF1</i>
	Perda	7q32.2	129586353	129654793	Nova Rara	1	<i>UBE2H</i>
	Perda	7p14.1	40237080	40285782	Rara	1	<i>C7orf10</i>
	Perda	7q11.21	65588230	65619078	Rara	1	<i>CRCP</i>
	Perda	7q11.23	74519176	74553581	Nova Rara	1	<i>GTF2IRD2B</i>
	Perda Mosaico	7q11.22	71154939	77866813	Rara	74	-
	Ganho	8p23.3	1277215	1368583	Rara	0	-
	Ganho	8p23.1	10696310	10763511	Nova Rara	2	<i>XKR6, PINX1</i>
	Perda	8q24.11	119107443	119122050	Rara	1	<i>EXT1</i>
	Perda	8q22.1	95592848	95646280	Nova Rara	0	-
	Perda	9q33.3	127866786	128094334	Rara	5	<i>GAPVD1, HSPA5, RABEPK, PPP6C, SCAI</i>
	Perda	9p22.1	18935679	19608840	Rara	10	<i>U92, SLC24A2, ACER2, RPS6, DENND4C, PLIN2, SCARNA8, HAUS6, RRAGA, FAM154A</i>
	Ganho	10p14	11195824	11306201	Nova Rara	1	<i>CELF2</i>
	Ganho	10q25.2	114871686	114949415	Nova Rara	1	<i>TCF7L2</i>
	Ganho	10q11.22	49882621	49976335	Nova Rara	1	<i>WDFY4</i>
	Ganho	10q23.1	87535110	87555478	Nova Rara	1	<i>GRID1</i>
	Ganho	10q23.2	87933723	87970988	Rara	1	<i>GRID1</i>
	Ganho Mosaico	10q26.2	128766924	135427143	Rara	26	-
	Ganho	11q23.3	117537377	117637276	Nova Rara	1	<i>DSCAML1</i>
	Ganho	11q24.3	128341740	128393147	Rara	1	<i>ETS1</i>
	Ganho	11p15.2	15982158	16013370	Nova Rara	1	<i>SOX6</i>

	Ganho	11p15.1	19769034	19836547	Nova Rara	2	<i>MIR4694, NAV2</i>
	Ganho	11p15.5	2655067	2729464	Rara	2	<i>KCNQ1OT1, KCNQ1</i>
	Ganho	11p11.2	44833576	44879501	Nova Rara	1	<i>TSPAN18</i>
	Perda	11q22.3	107670227	107707859	Rara	1	<i>SLC35F2</i>
	Perda	11p13	31557693	31600852	Rara	1	<i>ELP4</i>
	Ganho	12p13.2	11897763	11933866	Rara	1	<i>ETV6</i>
	Perda	12p13.33	865178	873931	Rara	1	<i>WNK1</i>
	Perda	12p13.2	11143615	11344743	Rara	7	<i>TAS2R42, LOC100129361, PRH1-PRR4, TAS2R30, TAS2R31, TAS2R19, TAS2R20</i>
	Perda	12q23.1	96828325	96867071	Nova Rara	0	-
	Perda	13q12.2	28628359	28643893	Nova Rara	1	<i>FLT3</i>
	Perda	13q21.2	60615604	60636297	Rara	2	<i>DIAPH3-AS1, DIAPH3</i>
	Perda	14q13.2	35336756	35487740	Rara	3	<i>SRP54, IGBP1P1, BAZ1A</i>
	Perda	14q13.2	36245012	36270153	Nova Rara	1	<i>RALGAP1</i>
	Perda	14q21.1	39512056	39562429	Nova Rara	1	<i>SEC23A</i>
	Perda	14q22.1	53027200	53057385	Nova Rara	1	<i>GPR137C</i>
	Perda	14q22.1	53111888	53158581	Nova Rara	1	<i>ERO1L</i>
	Perda	14q23.2	64764939	64792340	Nova Rara	1	<i>ESR2</i>
	Perda	14q23.3	67162092	67175405	Nova Rara	1	<i>GPHN</i>
	Ganho	15q12	27305700	27368219	Nova Rara	1	<i>GABRG3</i>
	Ganho	15q26.3	99253857	99272160	Nova Rara	1	<i>IGF1R</i>
	Perda	15q15.3	44688591	44756878	Nova Rara	2	<i>CTDSPL2, CASC4</i>
	Perda	15q21.2	50554457	51375075	Rara	11	-
	Perda	15q21.3	55679253	55799770	Rara	4	<i>DYX1C1-CCPG1, DYX1C1, FLJ27352, CCPG1</i>
	Ganho	16q12.2	56219785	56292826	Nova Rara	4	<i>MIR3935, DKFZP434H168, GNAO1, LOC283856</i>
	Ganho	16q24.3	90077121	90155062	Rara	5	<i>PRDM7, LOC100130015, C16orf3, GAS8, DBNDD1</i>
	Ganho	17q11.2	31378215	32894357	Rara	8	<i>CCL1, CCL13, CCL8, CCL11, CCL7, CCL2,</i>

	Mosaico						AA06,ASIC2
	Perda	17p11.2	19729764	19786946	Nova Rara	1	ULK2
	Perda	17q23.1	57943013	57996119	Nova Rara	2	RPS6KB1, TUBD1
	Perda	17q23.2	59036118	59061568	Nova Rara	1	BCAS3
	Perda	17q23.2	59969732	60004334	Nova Rara	1	INTS2
	Perda Mosaico	17q23.1	57700689	62067287	Rara	53	-
	Ganho	18q12.2	34954712	35140658	Rara	1	CELF4
	Perda	18p11.21	12654701	12697600	Nova Rara	3	CEP76, PSMG2, SPIRE1
	Ganho	20p12.1	16325028	16404080	Rara	1	KIF16B
	Ganho	20q13.31	56087126	56161799	Rara	2	PCK1, CTCFL
	Ganho	20q13.32	57163878	57232789	Nova Rara	3	STX16-NPEPL1, STX16, LOC149773
	Ganho	20q13.32	57845782	57898088	Rara	0	-
	Ganho	20q13.33	62705522	62775985	Rara	0	-
	Ganho	21q22.3	46489355	46619118	Nova Rara	2	ADARBI, SSR4P1
	Perda	21q22.2	40597055	40850995	Rara	7	SH3BGR, LCA5L, WRB, HMGNI, BRWD1-ASI, BRWD1-IT2, BRWD1
	Perda	22q11.21	18105222	18152600	Rara	0	-
	Perda	22q12.1	28547620	29304647	Rara	6	ZNRF3, XBPI, CCDC117, HSCB, CHEK2, TTC28
	Perda	22q13.2	41527451	41537460	Nova Rara	1	EP300
	Perda Mosaico	22q13.1	40864847	42163718	Rara	26	-
	Perda Mosaico	Xp22.33	168546	155233731	Rara	1006	-
LFL-9							
	Perda	2p22.3	34652397	34741027	Rara	0	-
	Ganho	6q16.1	95559566	95680018	Rara	0	-
	Perda	6q26	161848500	161888913	Rara	1	PARK2

LFL-10							
	Ganho	2p25.3	12770	73399	Rara	0	-
	Perda	4q28.3	136453394	136662189	Rara	0	-
	Perda	5q33.1	150223386	150289939	Rara	1	<i>ZNF300</i>
	cnLOH	6q22.31	124332292	138818601	Rara	87	-
	Perda	8q13.3	72200442	72226668	Rara	1	<i>EYA1</i>
	Perda	9p23	13920981	14026510	Nova Rara	1	<i>LINC00583</i>
	Perda	11p14.2	26992679	27247518	Nova Rara	2	<i>FIBIN, BBOX1</i>
	Ganho	Xq27.1	139803184	139813756	Rara	0	-
	cnLOH	Xp11.22	50378633	56766044	Rara	60	-
LFL-11							
	cnLOH	1p36.21	14180831	35253376	Rara	218	-
	cnLOH	1q32.2	208633535	223020639	Rara	83	-
	cnLOH	3p26.3	62613	5736952	Rara	16	-
	cnLOH	3q12.2	100203536	110923593	Rara	30	-
	cnLOH	3q28	191540183	197962454	Rara	64	-
	cnLOH	4p16.3	46690	5779317	Rara	75	-
	cnLOH	4q32.1	159245429	166095555	Rara	22	-
	cnLOH	4q32.3	170087506	190921709	Rara	79	-
	cnLOH	4q11	52686799	73637861	Rara	103	-
	cnLOH	5q22.3	113149471	124330522	Rara	39	-
	cnLOH	5q34	161447077	180692321	Rara	150	-
	cnLOH	5q15	95747362	109299609	Rara	27	-
	cnLOH	6q23.3	136351450	152481981	Rara	95	-
	Perda	6q12	69675506	69732732	Rara	1	<i>BAI3</i>
	cnLOH	7q36.1	151678247	157203356	Rara	27	-
	cnLOH	7p21.3	8522344	24493240	Rara	61	-
	cnLOH	8q22.1	97330690	124488121	Rara	114	-

	cnLOH	9p24.3	192128	27413212	Rara	106	-
	cnLOH	12q21.33	92220001	116904503	Rara	210	-
	cnLOH	13q22.1	74425982	102243185	Rara	104	-
	cnLOH	14q21.2	45194050	50423969	Rara	20	-
	cnLOH	14q23.1	59648737	79457240	Rara	180	-
	Ganho	16p12.1	25555213	26002786	Nova Rara	1	<i>HS3ST4</i>
	cnLOH	17p11.2	17053400	22217883	Rara	66	-
	cnLOH	17q11.1	25309336	49902448	Rara	499	-
	cnLOH	17q24.3	70142117	75230008	Rara	112	-
	cnLOH	18q11.2	23411751	33888078	Rara	49	-
	cnLOH	19q13.32	46529455	51879291	Rara	209	-
	cnLOH	20q12	41482656	49714321	Rara	111	-
	Ganho	Xp22.33	2368250	2390423	Rara	0	-
	cnLOH	Xq12	67281662	155233846	Rara	455	-
LFL-12							
	Perda	2p22.3	34642174	34763681	Rara	0	-
	Ganho	9q34.13	135795188	135811312	Nova Rara	1	<i>TSC1</i>
	Ganho	11p15.5	1230797	1455611	Rara	4	<i>MUC5B, TOLLIP, LOC255512, BRSK2</i>
	Ganho	22q13.33	50277936	50296515	Nova Rara	1	<i>ZBED4</i>
	Ganho	Xq26.2	132654912	132683333	Nova Rara	1	<i>GPC3</i>
	Ganho	Xq27.1	139803184	139812952	Rara	0	-
	Ganho	Xp11.23	49764383	49778602	Nova Rara	8	<i>CLCN5, MIR532, MIR188, MIR500A, MIR362, MIR501, MIR500B, MIR660</i>
	Ganho	Xp11.22	53436118	53477880	Rara	3	<i>SMC1A, RIBC1, HSD17B10</i>
	cnLOH	Xq11.1	61932503	67381901	Rara	14	-
	Ganho	Xq21.2	85285777	85384788	Rara	0	-
LFL-13							
	Ganho	5q31.3	140009291	140824117	Rara	68	-

	Ganho	6q27	169953396	170357142	Rara	7	<i>WDR27, C6orf120, PHF10, TCTE3, C6orf70, LINC00242, LINC00574</i>
	Ganho	8p23.3	1644816	2083571	Rara	6	<i>DLGAP2, CLN8, MIR596, ARHGEF10, KBTBD11, MYOM2</i>
	Ganho	9p22.2	16708087	16986789	Rara	1	<i>BNC2</i>
	Ganho	13q12.11	20699294	21050709	Rara	5	<i>GJA3, GJB2, GJB6, CRYL1, MIR4499</i>
	Ganho	13q12.11	23115560	23571532	Rara	1	<i>BASPI1</i>
	Ganho	16q24.2	88677498	89234449	Rara	5	<i>ZC3H18, ACSF3, IL17C, LINC00304, LOC400558</i>
LFL-14							
	Ganho	2p25.3	12770	330108	Rara	4	<i>FAM110C, SH3YL1, ACP1, FAM150B</i>
	cnLOH	7q31.2	116678595	121545899	Rara	16	-
	Perda	7p11.2	57936171	62471833	Rara	0	-
	cnLOH	8q24.21	127512962	139311570	Rara	36	-
	cnLOH	10q23.1	82377336	91144711	Rara	47	-
	cnLOH	11q23.3	119142513	124686863	Rara	70	-
	cnLOH	12q21.1	71666551	78571186	Rara	26	-
	cnLOH	14q21.2	46024609	57197024	Rara	49	-
	cnLOH	16p11.2	31609106	35220544	Rara	5	<i>KIAA0664L3, ZNF720, ZNF267, RN5S411, FLJ26245</i>
	cnLOH	17p13.2	6333200	13557909	Rara	141	-
	Ganho	20q13.33	61748879	62066793	Rara	11	-
	cnLOH	Xq24	118780462	143985954	Rara	123	-
	cnLOH	Xp22.13	17167203	20612684	Rara	22	-
	cnLOH	Xp11.22	52069921	55508714	Rara	46	-
	cnLOH	Xq11.1	61932503	65017558	Rara	12	-
	cnLOH	Xq13.1	70155324	78672703	Rara	79	-
	cnLOH	Xq21.1	80424469	83562000	Rara	6	<i>HMG5, SH3BGRL, POU3F4, CYLC1, RPS6KA6, hsa-mir-548i-4</i>

LFL-15							
	Ganho	1p36.33	2033255	3633308	Rara	16	-
	Ganho	5q31.3	140436338	140822723	Rara	39	-
	Ganho	9q34.3	139100614	140055522	Rara	63	-
	Ganho	20q13.33	61786565	62110696	Rara	11	-

cnLOH: regiões de homozigose sem variação no número de cópias.

* alterações em homozigose.

** (0) indica que a região não apresenta genes, *long non-coding* RNAs ou micro-RNAs descritos.

*** foram incluídos até 10 genes mapeados na região.

A distribuição das alterações ao longo dos 23 cromossomos está representada na Figura 3. O cromossomo X foi o que apresentou o maior número de alterações, com 24 no total, sendo 16 cnLOHs, sete ganhos e uma perda em mosaicismo. Por outro lado, apenas uma cnLOH foi identificada no cromossomo 19. As cnLOHs foram detectadas em 20 cromossomos, a exceção dos cromossomos 15, 21 e 22. Os ganhos genômicos também foram observados em 20 cromossomos; principalmente nos cromossomos 6, 10, 11, 20 e X; com sete alterações em cada um deles. O cromossomo 2 apresentou o maior número de perdas genômicas (11), enquanto os cromossomos 10, 16, 19, 20 e X não apresentaram perdas. As cinco alterações em mosaicismo foram encontradas nos cromossomos 7, 10, 17, 22 e X.

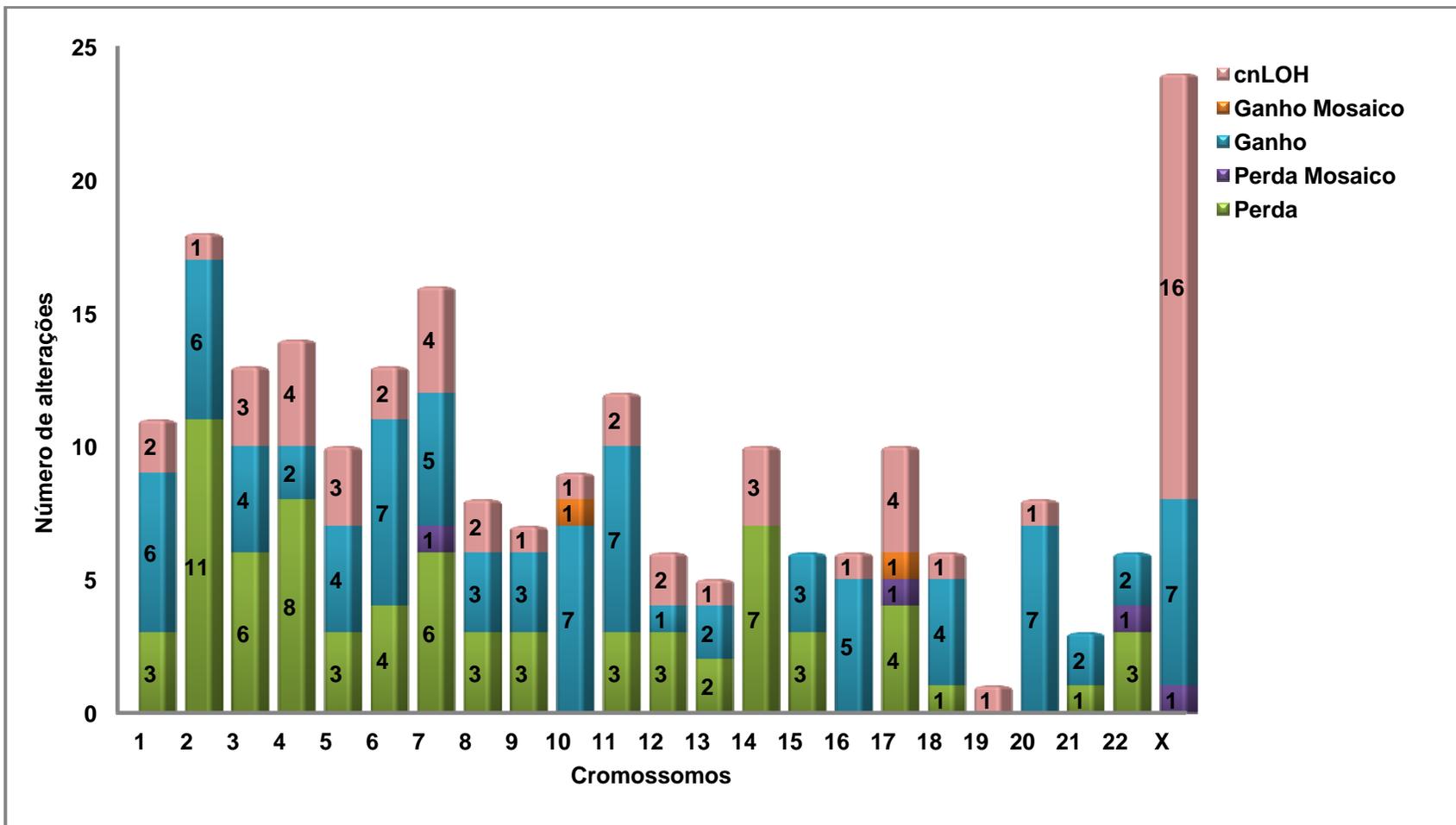


Figura 3 - Número e tipo de alterações genômicas (raras e novas raras) identificadas por cromossomo no grupo de pacientes com a Síndrome de Li-Fraumeni *like*.

O caso LFL-1 apresentou sete alterações genômicas distribuídas em cinco cromossomos distintos. O cromossomo 2 em particular apresentou três alterações, sendo que a perda em 2q34 englobou o *ERBB4* e o ganho em 2q31.1 abrangeu seis genes da família *HOXD*. A única alteração classificada como nova rara, o ganho em 15q26.3, compreendeu um único gene (*IGF1R*), enquanto a cnLOH em 11p11.2 englobou 54 genes.

No paciente LFL-2 foram identificadas seis alterações, sendo duas cnLOHs no cromossomo X, englobando um total de 40 genes, e uma perda em 1p31.2 que não compreendeu nenhum gene ou microRNA conhecido.

No caso LFL-3 foram detectadas oito alterações, sendo apenas uma perda em 5p12 (não envolvendo nenhum gene conhecido) e uma cnLOH (Xq11.1). Entre os seis ganhos, o único classificado como alteração nova rara estava mapeado em 10q11.22 e englobou o gene *ARHGAP22*.

O caso LFL-4 não apresentou nenhuma alteração genômica considerada rara ou nova rara. Esta paciente, hoje com 43 anos de idade, desenvolveu três tumores malignos ao longo de 25 anos (rabdomyossarcoma no membro inferior direito aos 13 anos de idade e câncer de mama aos 36 e 38 anos de idade) (Figura 4).

Foram identificadas três alterações no caso LFL-5, sendo dois ganhos e uma perda. O ganho em 2q31.1, assim como no caso LFL-1, englobou seis genes da família *HOXD*, enquanto o ganho em 6q25.3 abrangeu quatro genes, incluindo *IGFR2* e *SLC22A1*.

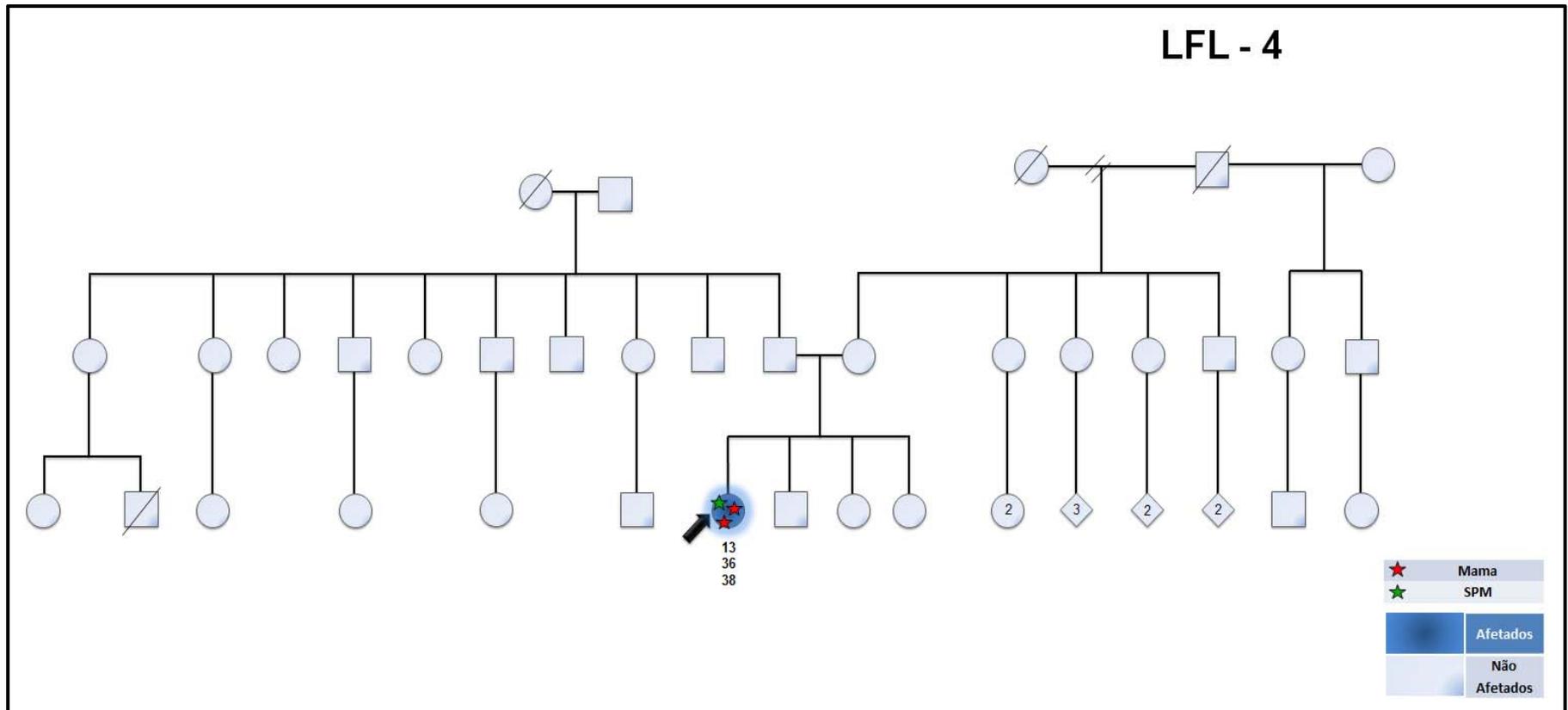


Figura 4 - A paciente LFL-4 apresentou três neoplasias (rabdmiossarcoma no membro inferior direito aos 13 anos de idade e câncer de mama aos 36 e 38 anos de idade) e não teve histórico familiar de neoplasias.

A paciente LFL-6 apresentou o menor número de alterações, sendo uma cnLOH em Xq11.1 (6.1 Mb) e um ganho de 256 Kb em 1q25.1 (incluindo apenas o gene *TNR*). A paciente de 42 anos de idade desenvolveu duas neoplasias, fibrossarcoma (ombro direito) aos sete anos de idade e câncer de tireoide aos 31 anos. A história familiar da paciente inclui uma tia materna e uma paterna com câncer de mama e uma prima materna com câncer de pulmão (Figura 5).

O caso LFL-7 apresentou seis alterações, das quais cinco foram cnLOH. A cnLOH em 2p14 englobou o maior número de genes (115) e as 3 cnLOHs detectadas no cromossomo X abrangeram um total de 67 genes.

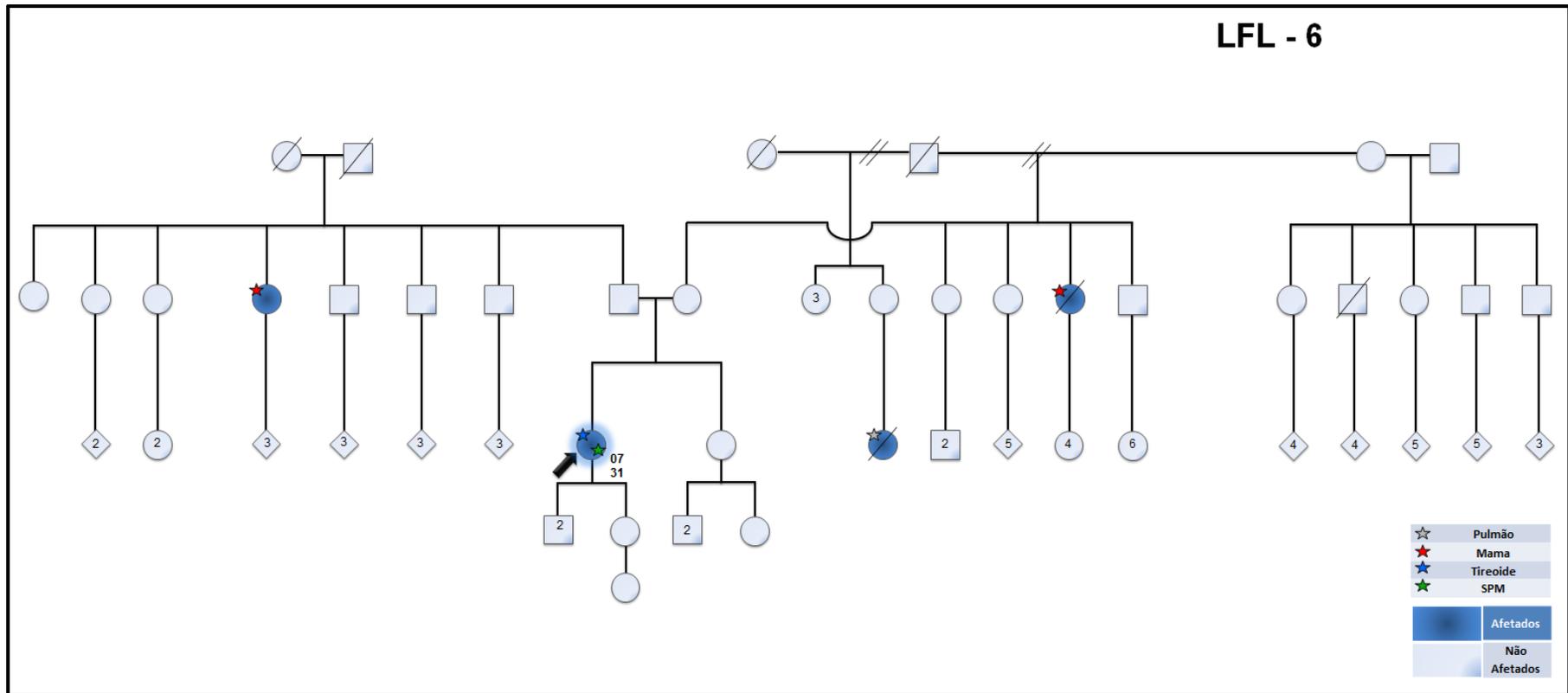


Figura 5 - A paciente LFL-6 apresentou duas neoplasias (fibrossarcoma no ombro direito aos sete anos de idade e câncer de tireóide aos 31 anos de idade) e história familiar de câncer de mama (tia materna e tia paterna) e de pulmão (prima materna).

A paciente LFL-8 apresentou o maior número de alterações genômicas raras e novas raras (109) encontradas neste grupo de pacientes. Os 47 ganhos foram identificados em 15 cromossomos (1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 15, 16, 18, 20 e 21) e apresentaram um tamanho médio de 62 Kb, enquanto as 62 perdas genômicas foram mapeadas em 19 cromossomos (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 18, 21 e X) e apresentaram em média 129 Kb. Esta paciente não apresentou cnLOHs e foi o único caso que apresentou alterações em mosaicismo (seis alterações), incluindo a perda de um cromossomo X (Figura 6). A análise cromossômica por bandamento realizada em 102 células confirmou o cariótipo 45,X/46,XX. A linhagem 46,XX foi detectada em 28,4% das células e a 45,X em 73,6% das células analisadas (Figura 7). Embora genotipicamente este seja um caso de Síndrome de Turner em mosaico, a paciente não apresenta sinal fenotípico característico da Síndrome.

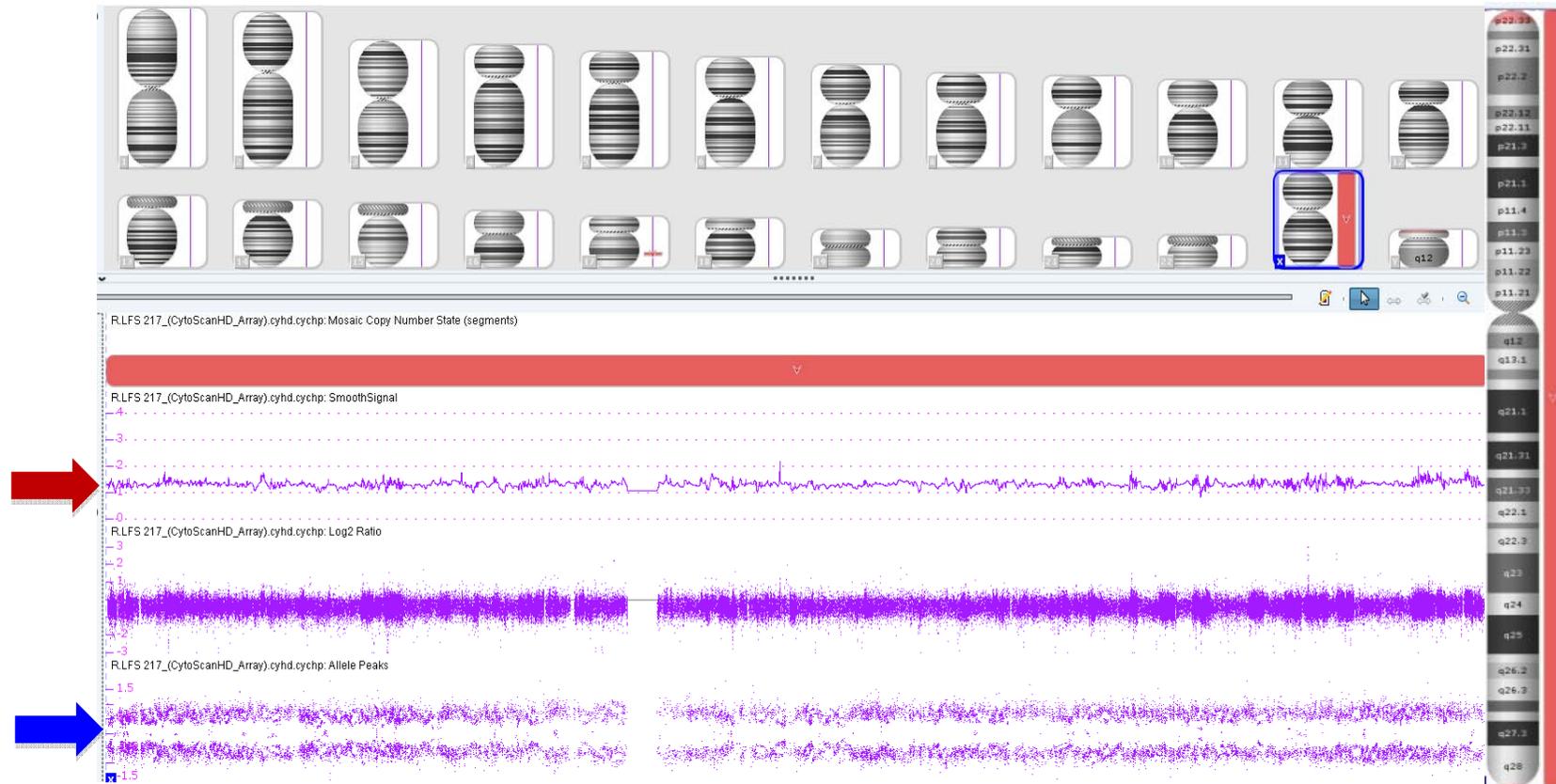


Figura 6 - Perda em mosaicismos do cromossomo X na paciente LFL-8, visualizada no *ChAS* (barra vermelha). A seta vermelha indica a linha representativa do *Smooth Signal* (estimativa do número de cópias), localizada entre 1 e 2. Quando ampliada a imagem a linha da seta vermelha se apresenta levemente acima do 1, indicando assim a perda em mosaicismos. A alteração foi detectada tanto pelas sondas polimórficas (seta vermelha) como não polimórficas (seta azul).

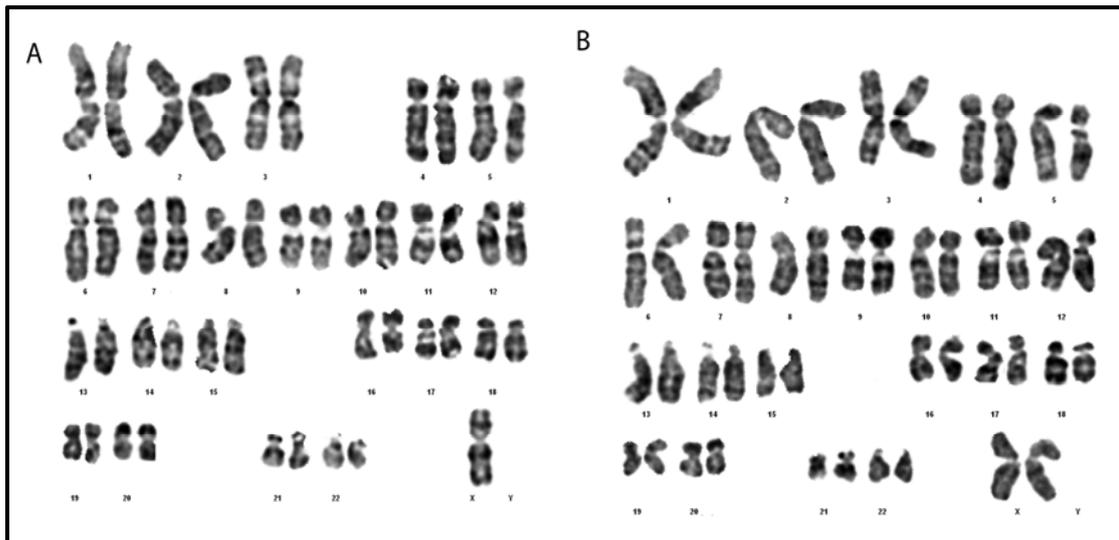


Figura 7 - Cariótipo obtido após bandamento em DAPI-reverso revelando mosaicismo 45,X/46,XX característico da Síndrome de Turner. **A.** Célula com cariótipo 45,X e **B.** Célula com cariótipo 46,XX.

Pesquisa detalhada da paciente LFL-8, hoje com 56 anos de idade, revelou que aos 29 anos deu entrada no A.C. Camargo Cancer Center para tratar de um carcinoma papilífero da tireoide sendo realizado tireoidectomia total. Após seis anos (35 anos de idade), foi diagnosticada e tratada cirurgicamente de um sarcoma de partes mole no flanco direito do tórax. Aos 42 anos de idade foi diagnosticada com miomatose uterina e realizado uma histerectomia. Quatro anos mais tarde (46 anos), um cisto ovariano complexo foi diagnosticado e removido cirurgicamente por ooforectomia. Além disso, foi diagnosticada com angiomiolipoma aos 51 anos de idade e ao longo dos últimos quatro anos, uma ilhota de gordura na mama direita vem sendo observada. A paciente foi a quarta de cinco irmãos de pais não consanguíneos caucasianos. Seu pai teve câncer de próstata aos 86 anos e sua mãe foi a óbito por um acidente vascular cerebral aos 66 anos. O histórico familiar também inclui parentes maternos com câncer (avô com câncer gástrico, uma tia com câncer endometrial e uma prima com câncer de mama). Em conjunto, os dados familiares

são compatíveis com a Síndrome de Li-Fraumeni *like* (critérios de Eeles¹). A probanda teve dois filhos biológicos (uma menina e um menino, hoje com 23 e 29 anos de idade, respectivamente), ambos sem nenhum tipo de neoplasias até o momento (Figura 8).

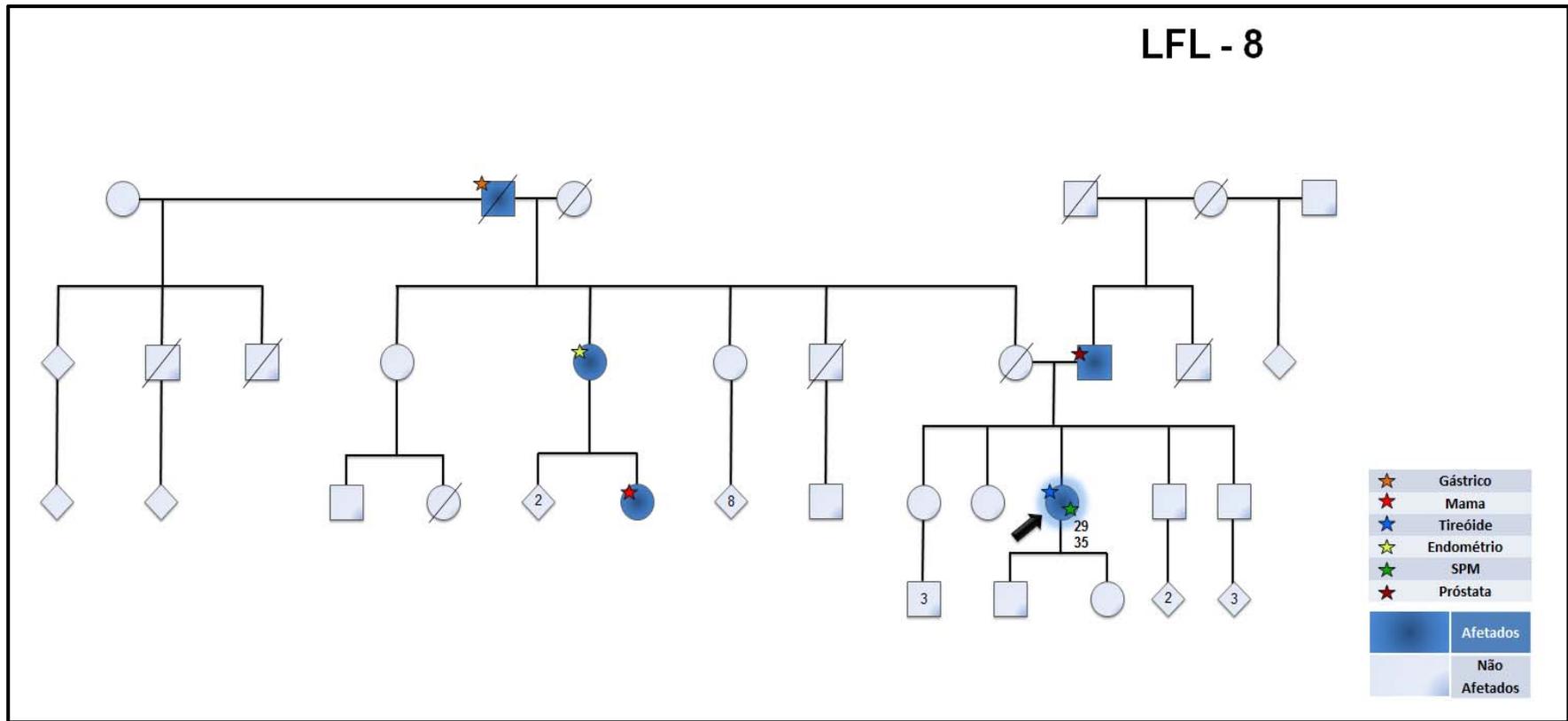


Figura 8 - A paciente LFL-8 apresentou duas neoplasias (câncer de tireóide aos 29 anos e sarcoma de partes moles em flanco direito aos 35 anos) e extensa história familiar de câncer: pai com câncer de próstata, tia materna com câncer de endométrio, prima materna com câncer de mama e avô materno com câncer gástrico.

No paciente LFL-9 foram observadas três alterações, sendo que apenas a perda em 6q26 incluía um gene conhecido, *PARK2*.

O caso LFL-10 apresentou nove alterações (cinco perdas, dois ganhos e duas cnLOHs), das quais duas perdas foram classificadas como novas raras e englobaram os genes *LINC00583* (9p23) e *FIBIN/BBOX1* (11p14.2).

O caso LFL-11 teve 31 alterações, incluindo o maior número de cnLOHs (28) entre todos os casos avaliados. Esta alteração foi detectado em 16 cromossomos (1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20 e X) e englobou, em média, 119 genes. Em particular, as cnLOHs em 17q11.1 e Xq12 abrangeram um grande número de genes, com 499 e 455 respectivamente. Também apresentou uma perda genômica em 6q12 envolvendo o gene *BAI3*. A paciente é filha de pais não consanguíneos e desenvolveu duas neoplasias em 10 anos (câncer de útero aos 41 anos e câncer de pâncreas aos 51 anos de idade). A história familiar revelou que a avó materna teve câncer de sistema nervoso central e de tireoide, três primas maternas desenvolveram câncer de colo de útero, leucemia e linfoma de Hodgkin (Figura 9).

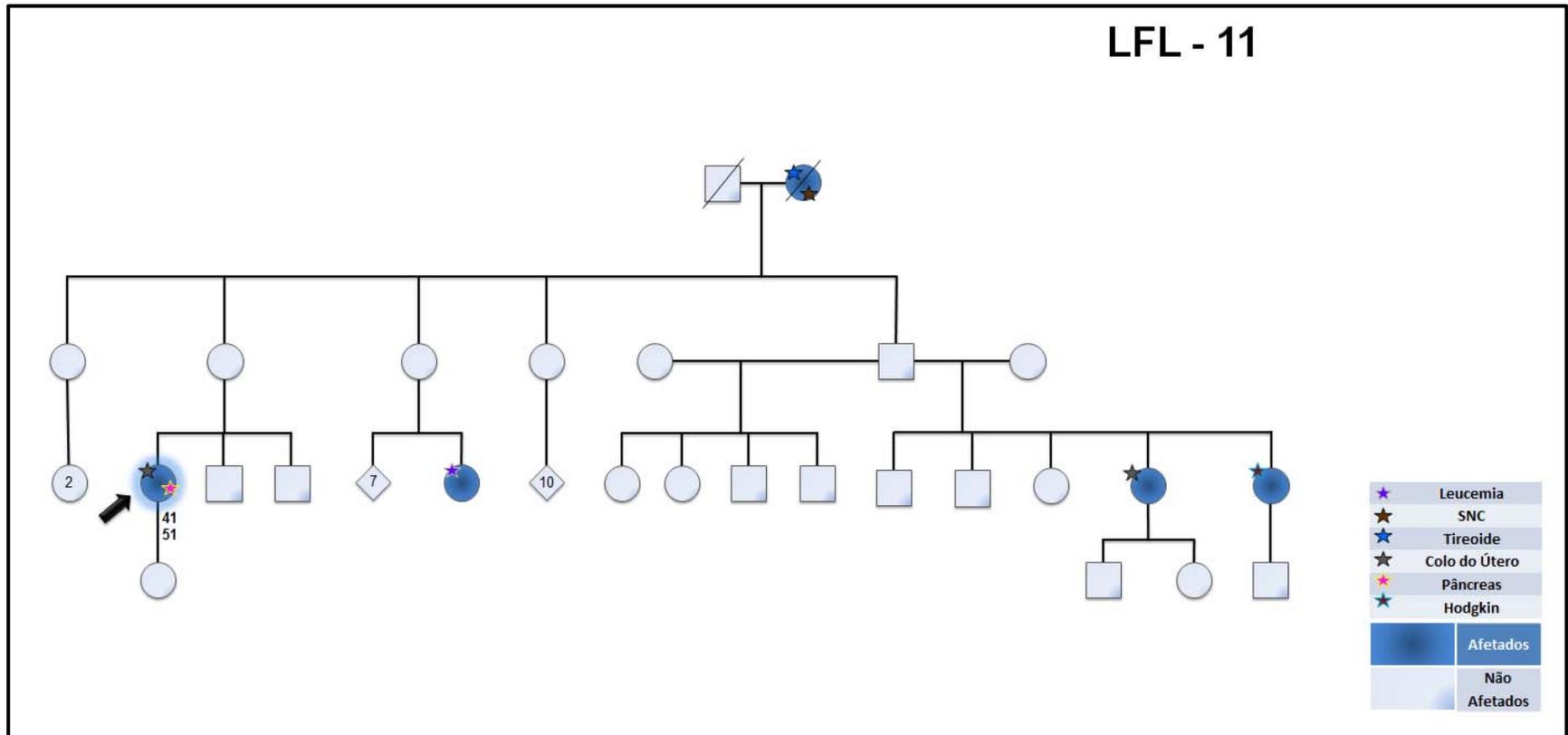


Figura 9 - A paciente LFL-11 apresentou duas neoplasias (câncer de colo de útero aos 41 anos e câncer de pâncreas aos 51 anos de idade) e avó materna com câncer de SNC e de tireoide, assim como primas maternas com leucemia, câncer de colo de útero e linfoma de Hodgkin.

O paciente LFL-12 apresentou 10 alterações, sendo oito ganhos, uma perda (2p22.3) e uma cnLOH (Xq11.1). No cromossomo X foram observadas seis alterações, sendo que o ganho em Xp11.23 englobou oito genes (sete microRNAs).

No caso LFL-13 foram observadas apenas ganhos genômicos (sete e envolvendo seis cromossomos), as quais englobaram pelo menos um gene. Todas as alterações foram raras. Em particular, o ganho em 5q31.3 abrangeu 68 genes.

No caso LFL-14 foram identificadas 14 cnLOHs, além de dois ganhos e uma perda. As cnLOHs foram detectadas em nove cromossomos diferentes e englobaram 48 genes, em média. O cromossomo X apresentou seis cnLOHs, enquanto a cnLOH em 17p13.2 englobou mais de 100 genes. Esta paciente é filha de pais não consanguíneos e desenvolveu três tumores malignos na sétima década de vida (carcinoma de língua aos 73 anos, câncer de endométrio aos 74 anos e câncer de tireoide aos 77 anos de idade). O seu histórico familiar mostra um irmão com câncer de próstata, uma filha com câncer de mama, uma sobrinha também com câncer de mama e um neto com leucemia (Figura 10).

O caso LFL-15 apresentou apenas quatro ganhos em diferentes cromossomos (1, 5, 9 e 20), que englobaram em média 32 genes. Os heredogramas com os dados dos familiares de todos os probandos que não foram apresentados nos texto encontram-se em anexo (Anexo 2).

Foram comparadas as alterações presentes nos pacientes com LFL com o objetivo de identificar regiões comuns que estivessem associadas com a síndrome LFL. Para esta análise não foram consideradas as alterações detectadas no caso LFL-8 (com um grande número de alterações) pois parece representar uma entidade completamente diferente dos demais pacientes. As regiões com cnLOHs também não

foram consideradas, pois precisam de validação por sequenciamento para confirmação de mutações patogênicas em homozigose. O Quadro 7 resume as alterações compartilhadas entre estes pacientes.

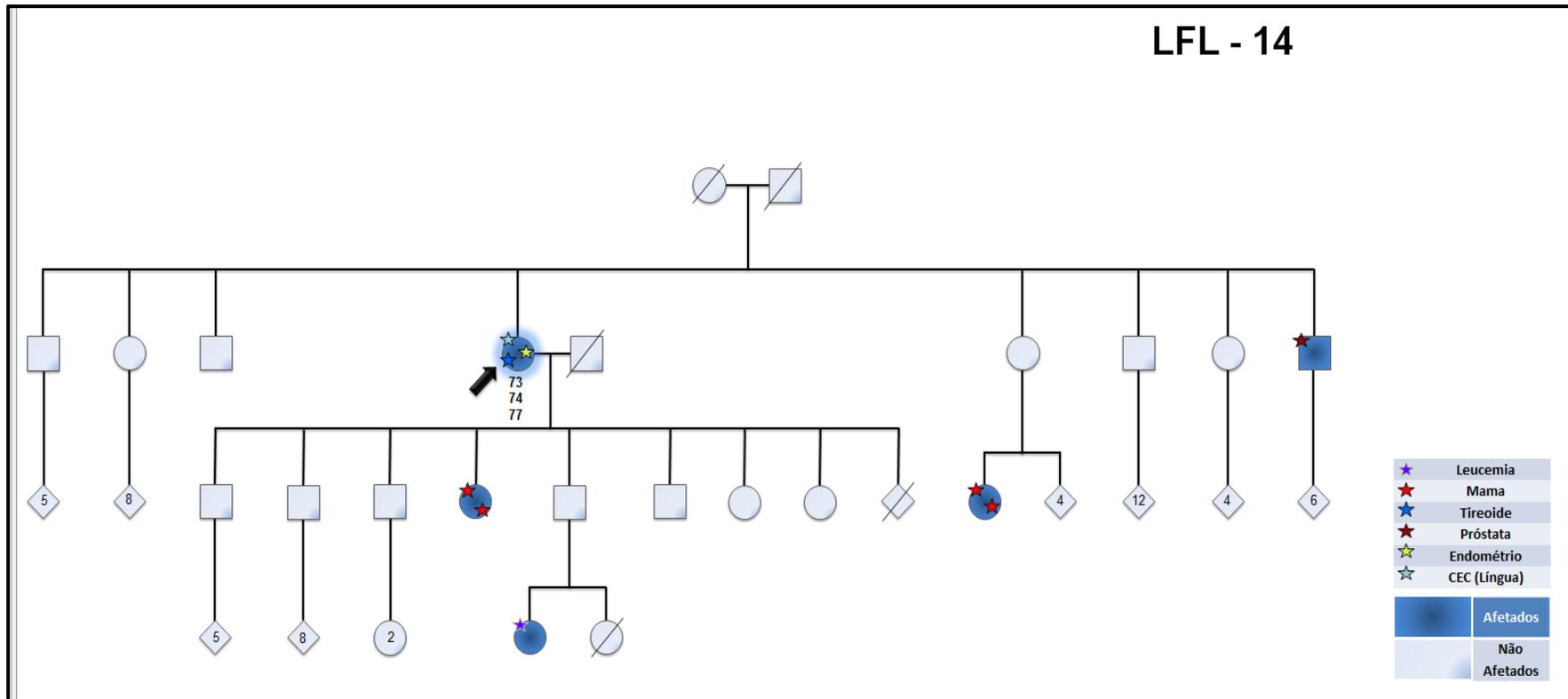


Figura 10 - A paciente LFL-14 apresentou três neoplasias (carcinoma de língua aos 73 anos, câncer de endométrio aos 74 anos e câncer de tireoide aos 77 anos de idade) e história familiar de câncer de próstata (irmão), câncer de mama (filha e sobrinha) e leucemia (neto).

Quadro 7 - Alterações genômicas compartilhadas entre os pacientes com a síndrome de Li-Fraumeni *like*.

Região	Início	Fim	Genes	LFL-1	LFL-2	LFL-5	LFL-7	LFL-9	LFL-10	LFL-12	LFL-13	LFL-14	LFL-15		
2p25.3	12770	73399	NA						G			G			
2p25.3	206002	330108	<i>SH3YL1</i>	G								G			
			<i>ACPI</i>	G									G		
			<i>FAM150B</i>	G									G		
2p22.3	34652397	34741027	NA				P		P						
2q31.1	176928696	177058451	<i>EVX2</i>	G		G									
			<i>HOXD13</i>	G		G									
			<i>HOXD12</i>	G		G									
			<i>MTX2</i>	G		G									
			<i>MIR10B</i>	G		G									
			<i>HOXD4</i>	G		G									
			<i>HOXD3</i>	G		G									
			<i>HOXD1</i>	G		G									
			<i>HOXD-AS1</i>	G		G									
4q11/ 4q13.2	69333761	69584322	<i>TMPRSS11E</i>	P											
5q31.3	140436338	140822723	<i>PCDHB1</i>								G		G		
			<i>PCDHB2</i>									G		G	
			<i>PCDHB3</i>										G		G
			<i>PCDHB4</i>										G		G
			<i>PCDHB5</i>										G		G
			<i>PCDHB6</i>										G		G
			<i>PCDHB17</i>										G		G
			<i>PCDHB7</i>										G		G
			<i>PCDHB8</i>										G		G
			<i>PCDHB16</i>										G		G

			<i>PCDHB9</i>								G		G
			<i>PCDHB10</i>								G		G
			<i>PCDHB11</i>								G		G
			<i>PCDHB12</i>								G		G
			<i>PCDHB13</i>								G		G
			<i>PCDHB14</i>								G		G
			<i>PCDHB18</i>								G		G
			<i>PCDHB19P</i>								G		G
			<i>PCDHB15</i>								G		G
			<i>SLC25A2</i>								G		G
			<i>TAF7</i>								G		G
			<i>PCDHGA1</i>								G		G
			<i>PCDHGA2</i>								G		G
			<i>PCDHGA3</i>								G		G
			<i>PCDHGB1</i>								G		G
			<i>PCDHGA4</i>								G		G
			<i>PCDHGB2</i>								G		G
			<i>PCDHGA5</i>								G		G
			<i>PCDHGB3</i>								G		G
			<i>PCDHGA6</i>								G		G
			<i>PCDHGA7</i>								G		G
			<i>PCDHGB4</i>								G		G
			<i>PCDHGA8</i>								G		G
			<i>PCDHGB5</i>								G		G
			<i>PCDHGA9</i>								G		G
			<i>PCDHGB6</i>								G		G
			<i>PCDHGA10</i>								G		G
			<i>PCDHGB7</i>								G		G

			<i>PCDHGA11</i>								G		G	
			<i>PCDHGB8P</i>								G		G	
			<i>PCDHGA12</i>								G		G	
16q24.2	88677498	88974162	<i>ZC3H18</i>		G						G			
			<i>IL17C</i>		G						G			
20q13.33	61786565	62066793	<i>Hsa-miR124-3</i>									G	G	
			<i>YTHDF1</i>										G	G
			<i>BIRC7</i>										G	G
			<i>MIR3196</i>										G	G
			<i>NKAIN4</i>										G	G
			<i>FLJ16779</i>										G	G
			<i>ARFGAP1</i>										G	G
			<i>MIR4326</i>										G	G
			<i>COL20A1</i>										G	G
			<i>CHRNA4</i>										G	G
			<i>KCNQ2</i>								G	G		
Xq12/ Xq27.1	139803184	139812952	NA						G	G				

G: ganho; P: perda.

5.2 PACIENTES PORTADORES DE MÚLTIPLOS TUMORES PRIMÁRIOS

No grupo de pacientes classificados como portadores de múltiplos tumores primários foram encontradas 193 alterações genômicas sendo 73 ganhos (tamanho médio de 287 Kb) 84 perdas (tamanho médio de 636 Kb) e 36 cnLOHs (tamanho médio de 18 Mb). Do total de perdas genômicas, apenas uma foi identificada em mosaicismo (7q22.1) no caso MT-2, enquanto nove foram observadas em homozigose nos pacientes MT-2 (11p15.4), MT-6 (8p11.2), MT-7 (8p11.2), MT-8 (8p11.2), MT-11 (11p15.4), MT-12 (3q21.3), MT-13 (11q11) e MT-14 (1q44 e 8p11.2).

A grande maioria de alterações foi classificada como comum (111) enquanto 67 foram consideradas raras e 15 como novas raras. A única alteração detectada em mosaicismo foi classificada como rara e apenas uma das nove perdas em homozigose foi classificada como rara (11p15.4 em MT-14). Os tipos de CNVs e cnLOHs e sua classificação em comuns raras e novas raras está representada no Quadro 8.

Quadro 8 - Tipo e classificação das alterações encontradas nos pacientes MT.

Tipo de alteração	Nova rara	Rara	Comum	TOTAL
Ganho	8	21	44	73
Perda (homozigose)	7	9 (1)	67 (8)	83
Perda em mosaico	0	1	0	1
cnLOH	0	36	0	36
TOTAL	15	67	111	193

Assim como foi feito para os casos LFL, Foram descritas em detalhes as 82 alterações consideradas raras e novas raras. As CNVs e cnLOHs raras e novas raras identificadas em cada um dos pacientes MT estão apresentadas no Quadro 9.

Os cromossomos 10 e 21 não apresentaram nenhum tipo de alteração genômica. Foram identificadas apenas uma alteração nos cromossomos 17 e 22 sendo uma cnLOH em 17q11.1 (10 Mb) e um ganho em 22q13.33 (20 Kb). Por outro lado, novamente o cromossomo X apresentou o maior número de alterações (12) incluindo o maior número de ganhos (6), duas perdas e quatro cnLOHs. As cnLOHs foram detectadas em 18 cromossomos sendo quatro no cromossomo X. Os ganhos foram identificados em 17 cromossomos e 12 deles (1, 2, 4, 5, 6, 8, 11, 13, 15, 19, 20 e 22) apresentaram um único ganho. Em relação às perdas, o cromossomo 2 apresentou o maior número de eventos para este tipo de alteração (3) enquanto sete cromossomos de um total de 11 exibiram uma única perda cada. Foi detectada uma alteração em mosaïcismo (perda) no cromossomo 7, mais especificamente em 7q22.1. A distribuição das alterações está representada na Figura 12. Foi identificada no mínimo uma alteração genômica nos pacientes MT (Figura 11).

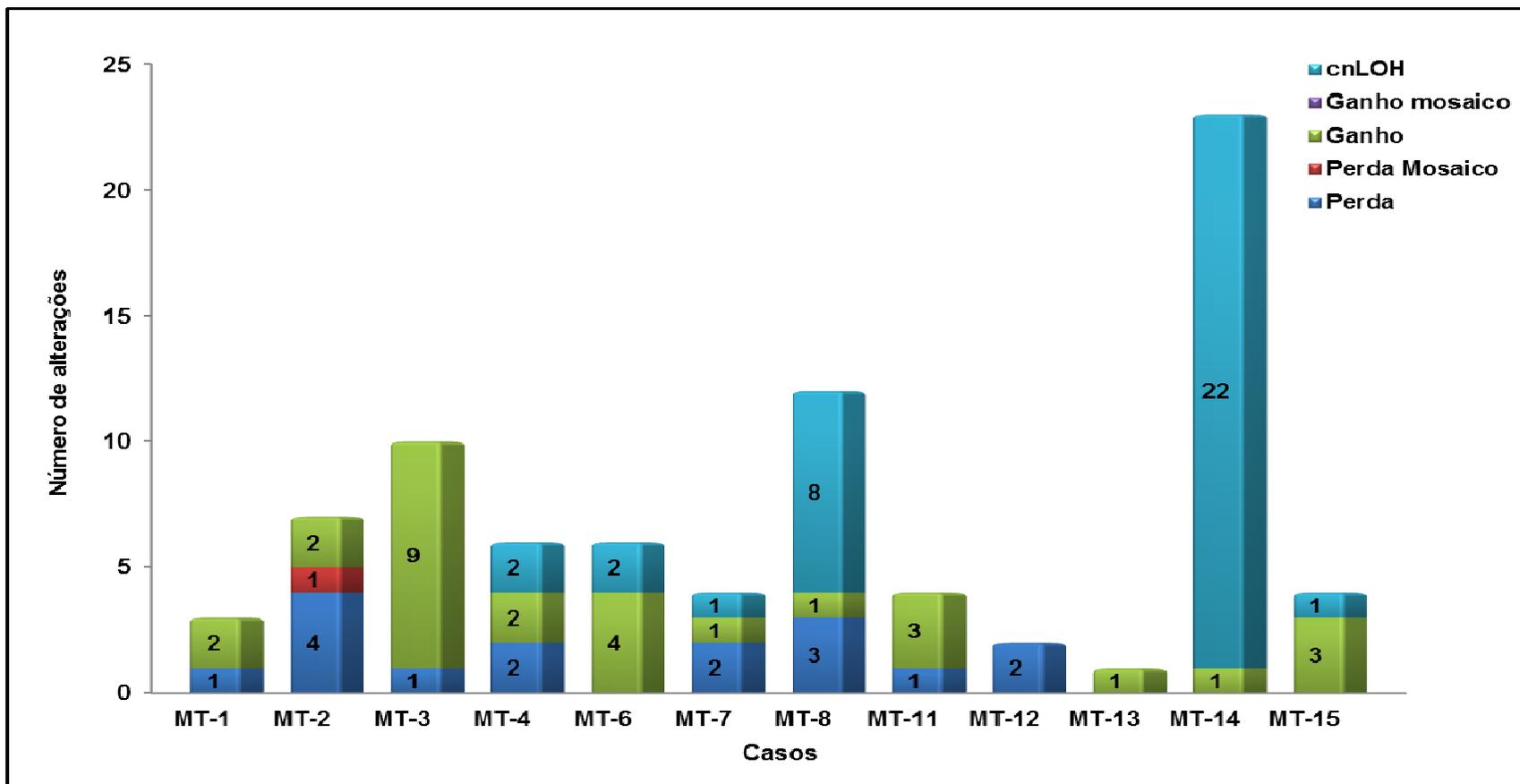


Figura 11 - Número de alterações genômicas raras e novas raras detectadas em cada caso do grupo de pacientes com múltiplos tumores primários.

Quadro 9 - Alterações raras e novas raras encontradas nos 12 pacientes MT assim como o número de genes mapeados em cada região.

CASOS	EVENTO	CITOBANDA	INÍCIO	FIM	CLASSIFICAÇÃO	Nº DE GENES*	GENES**
MT-1							
	Perda	5p12	45980867	46377314	Rara	0	-
	Ganho	16q24.2	88330597	89105217	Rara	1	<i>ZC3H18</i>
	Ganho	20q13.33	61775756	62066793	Rara	11	-
MT-2							
	Perda	2q22.1	141869126	141892634	Nova Rara	1	<i>LRP1B</i>
	Perda	2q34	213162299	213187551	Rara	1	<i>ERBB4</i>
	Perda	4q28.3	134918952	135191179	Nova Rara	1	<i>PABPC4L</i>
	Perda Mosaico	7q22.1	100811078	142426331	Rara	267	-
	Ganho	9q34.2	137096694	137172742	Rara	0	-
	Perda	9q22.31	95120456	95153764	Nova Rara	2	<i>CENPP OGN</i>
	Ganho	22q13.33	50276115	50296515	Nova Rara	1	<i>ZBED4</i>
MT-3							
	Ganho	4q13.3	74692017	74981420	Nova Rara	9	<i>CXCL6 PF4V1 CXCL1 PF4 PPBP CXCL5 CXCL3 PPBPP2 CXCL2</i>
	Ganho	5q31.3	140436338	140824117	Rara	39	-
	Perda	6q26	162862392	163133554	Rara	1	<i>PARK2</i>

	Ganho	7q11.21	64166578	64435923	Rara	3	<i>ZNF107 ZNF138 ZNF273</i>
	Ganho	7q21.11	80532028	80796081	Nova Rara	1	<i>SEMA3C</i>
	Ganho	13q12.11	23223089	23506365	Rara	1	<i>BASP1P1</i>
	Ganho	15q14	34621751	34888269	Rara	4	<i>SLC12A6 NOP10 C15orf55 LPCAT4</i>
	Ganho	18q22.3	72763024	73024458	Rara	3	<i>ZNF407 ZADH2 TSHZ1</i>
	Ganho	18q23	74060934	74333309	Rara	2	<i>ZNF516 LOC284276</i>
	Ganho	18q23	77122543	77405773	Rara	2	<i>ATP9B NFATC1</i>
MT-4							
	Perda	5p12	45922107	46365514	Rara	0	-
	cn-LOH	7q22.1	99335985	147993896	Rara	380	-
	Ganho	8q11.21	49488350	49846197	Nova Rara	2	<i>EFCAB1 SNAI2</i>
	Perda	8q11.21	50328083	50642906	Nova Rara	0	-
	Ganho	16q24.2	88338595	88966513	Rara	1	<i>ZC3H18</i>
	cn-LOH	19p13.2	11104120	16372158	Rara	154	-
MT-6							
	Ganho	2q34	213231739	213274555	Nova Rara	1	<i>ERBB4</i>
	Ganho	19q13.42	56221455	56286754	Rara	1	<i>NLRP9</i>
	Ganho	Xq21.2	85271353	85400442	Rara	1	<i>CHM</i>
	cn-LOH	Xp11.22	50621579	58337890	Rara	70	-
	cn-LOH	Xq11.1	61932503	66974524	Rara	13	-
	Ganho	Xp11.23	49036284	49094989	Nova Rara	4	<i>PRICKLE3 SYP</i>

							<i>CACNA1F CCDC22</i>
MT-7							
	Perda	4q27	122261355	122299473	Rara	1	<i>QRFPR</i>
	cn-LOH	11p11.2	46187582	51563636	Rara	53	-
	Perda	15q24.3	76841812	76920081	Rara	1	<i>SCAPER</i>
	Ganho	16p13.3	8588	147965	Rara	5	<i>POLR3K SNRNP25 RHBDF1 MPG NPRL3</i>
MT-8							
	Ganho	1p36.33	2140721	2267557	Rara	3	<i>C1orf86 SKI MORN1</i>
	cn-LOH	2p23.3	25070350	35622457	Rara	99	-
	cn-LOH	4q25	113854559	121555267	Rara	25	-
	cn-LOH	8p21.3	21877381	38440955	Rara	132	-
	cn-LOH	8q24.23	139751301	146292734	Rara	99	-
	cn-LOH	11q12.3	62237316	76364726	Rara	321	-
	Perda	13q12.11	20797314	21034197	Rara	3	<i>GJB6 CRYL1 MIR4499</i>
	cn-LOH	16p12.1	27448400	35220544	Rara	109	-
	cn-LOH	20p11.23	20061756	26289925	Rara	45	-
	cn-LOH	20q11.21	29448795	37267729	Rara	138	-
	Perda	Xq26.3	135984842	136009186	Nova Rara	0	-
	Perda	Xq27.1	138254366	138264164	Nova Rara	1	<i>FGF13</i>
MT-11							
	Ganho	6q27	170813494	170876734	Nova Rara	2	<i>PSMB1 TBP</i>
	Ganho	9p24.1	6973531	7090261	Nova Rara	1	<i>KDM4C</i>

	Perda*	11p15.4	5748221	5844861	Rara	1	<i>OR56B1</i>
	Ganho	Xp22.33	757627	980845	Rara	0	-
MT-12							
	Perda	2p13.1	73852585	73890530	Rara	2	<i>NAT8 ALMS1P</i>
	Perda	14q31.1	82374599	82430957	Nova Rara	0	-
MT-13							
	Ganho	7p12.1	53359875	53458675	Rara	0	-
MT-14							
	cn-LOH	1p36.12	22547351	41854557	Rara	293	-
	cn-LOH	2p24.1	23108115	28821149	Rara	85	-
	cn-LOH	3p21.2	51410063	90485635	Rara	166	-
	cn-LOH	3q11.1	93536053	119533256	Rara	134	-
	cn-LOH	4q13.3	71443440	86694519	Rara	107	-
	cn-LOH	5q23.2	125872149	166884749	Rara	362	-
	cn-LOH	7p22.3	44166	6614298	Rara	74	-
	cn-LOH	8p21.2	25009088	43778914	Rara	121	-
	cn-LOH	9p24.2	4349211	40087758	Rara	208	-
	cn-LOH	11q22.1	97770105	132495311	Rara	297	-
	cn-LOH	12p12.1	25628016	34835837	Rara	42	-
	cn-LOH	12q11	37857750	89758139	Rara	443	-
	cn-LOH	13q13.3	36260375	55604433	Rara	139	-
	cn-LOH	14q21.3	47696064	59222565	Rara	60	-
	cn-LOH	16p13.3	7436173	35220544	Rara	230	-

	cn-LOH	16q11.2	46464488	55873409	Rara	40	-
	cn-LOH	17q11.1	25309336	35207554	Rara	158	-
	cn-LOH	18q11.1	18540833	44157506	Rara	101	-
	cn-LOH	18q21.32	57125320	78014582	Rara	67	-
	cn-LOH	19p13.2	7644963	13521790	Rara	195	-
	Ganho	Xq27.1	139803184	139813756	Rara	0	-
	cn-LOH	Xp11.4	39739273	58337890	Rara	192	-
	cn-LOH	Xq11.1	61932503	95690820	Rara	142	-
MT-15							
	cn-LOH	1p36.21	14581038	23050352	Rara	101	-
	Ganho	11p15.1	18894415	19000537	Rara	0	-
	Ganho	Xq26.3	134848793	134985245	Rara	1	<i>SAGE1</i>
	Ganho	Xq27.1	139804656	139813756	Rara	0	-

cnLOH: regiões de homozigose sem variação no número de cópias.

* alterações em homozigose.

** (0) indica que a região não apresenta genes, *long non-coding* RNAs ou micro-RNAs descritos.

*** foram incluídos até 10 genes mapeados na região.

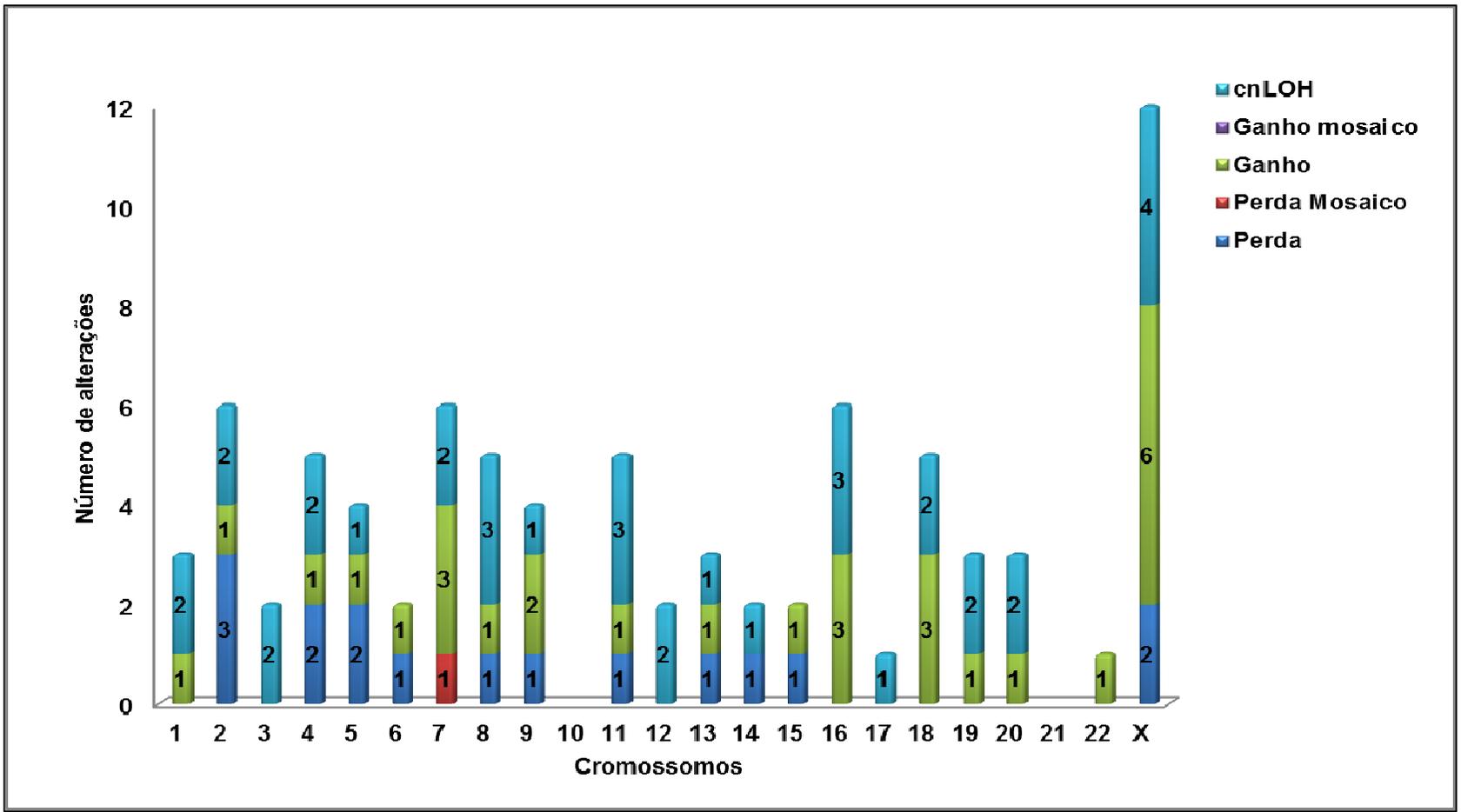


Figura 12 - Número e tipo de alterações genômicas raras e novas raras identificadas por cromossomo no grupo de pacientes com múltiplos tumores primários.

Seis casos (MT-1, MT-7, MT-11, MT12, MT-13 e MT-15) apresentaram um pequeno número de alterações. O caso MT-1 apresentou três alterações (uma perda e dois ganhos), a perda mapeada em 5p12 não englobou genes ou microRNAs conhecidos. Os casos MT-7, MT-11 e MT-15 apresentaram quatro alterações cada, sendo três ganhos para os pacientes MT-11 e MT-15. A cnLOH em 1p36.21 detectada no MT-15 englobou um grande número de genes (101). A cnLOH em 11p11.2 identificada no MT-7 abrangeu 53 genes. O caso MT-12 teve duas perdas genômicas uma mapeada em 2p13.1 englobando *NAT8* e *ALMS1P* e a outra em 14q31.1 (não tem genes conhecidos).

O caso MT-13 apresentou o menor número de alterações sendo um ganho em 7p12.1 (99 Kb), classificado como alteração rara e sem genes conhecidos mapeados nessa região. O paciente de 24 anos de idade desenvolveu duas neoplasias em idade jovem (tumor de Wilms aos seis anos de idade e um tumor de sistema nervoso central aos 14 anos). O avô paterno deste paciente tem história de câncer de pâncreas, o avô materno apresentou câncer gástrico e a avó materna e dois tios maternos de segundo grau também foram acometidos por câncer de sítio indeterminado (Figura 13).

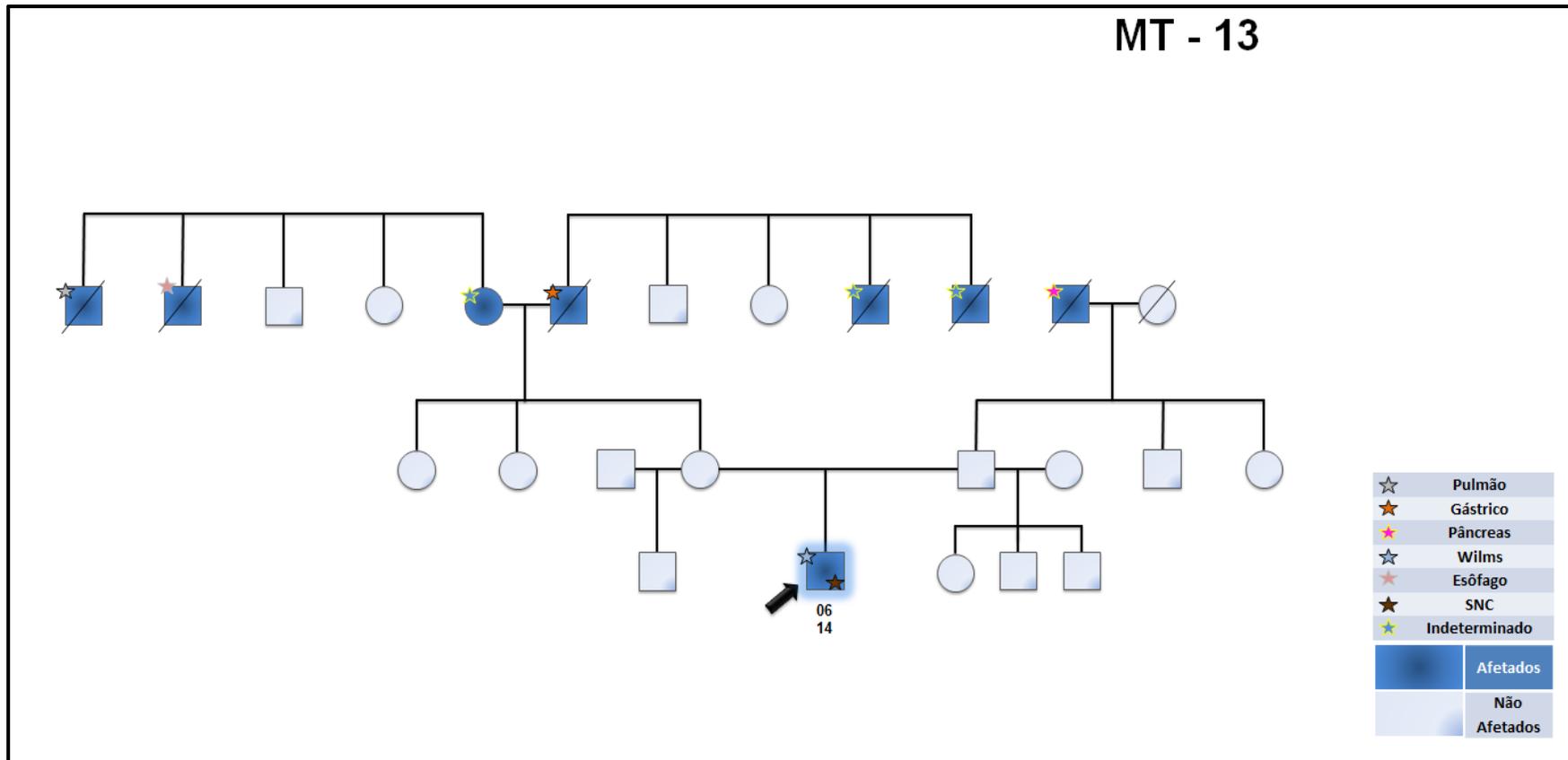


Figura 13 - O paciente MT-13 apresentou duas neoplasias (tumor de Wilms aos seis anos e câncer de sistema nervoso central aos 14 anos de idade). A história familiar do paciente inclui câncer de pâncreas (avô paterno), câncer gástrico (avô materno) e câncer de origem indeterminada (avó materna e dois tios maternos de segundo grau).

Os casos MT-2 e MT-4 apresentaram alterações genômicas que abrangeram um grande segmento da mesma região do cromossomo 7q22. Foram detectadas sete alterações no caso MT-2 incluindo uma perda em mosaicismo de 80% em 7q22.1 (42 Mb) (Figura 14). Esta paciente desenvolveu múltiplas neoplasias em um período inferior a sete anos (neoplasia de mama aos 58 anos, linfoma não-Hodgkin aos 63 anos, carcinoma de células escamosas de lábio aos 65 anos e neoplasia em órbita ocular aos 69 anos). Há extenso histórico de câncer nesta família: mãe com câncer colorretal, pai com tumor de cabeça e pescoço, tia materna com tumor de cabeça e pescoço, tia materna com câncer de mama, avô materno com câncer de origem indeterminada, primo materno com câncer colorretal, tio paterno com câncer de pulmão, tia paterna com leucemia e prima paterna com câncer de mama. O carcinoma de mama é o tumor de maior prevalência nesta família (Figura 15) e por este motivo a probanda foi testada para mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2*. Não foram identificadas mutações patogênicas. Entretanto, algumas alterações sem relevância clínica foram observadas no gene *BRCA2* (Quadro 10).

Um dos filhos da paciente MT-2 (com 34 anos do sexo masculino e sem câncer até o momento) também foi avaliado com a plataforma *CytoScan HD* sendo detectadas apenas alterações comuns. Infelizmente não foi possível avaliar as alterações genômicas da filha da paciente MT-2 (com 42 anos de idade).

Quadro 10 - Alterações encontradas no gene *BRCA2* de acordo com o banco de dados BIC e nomenclaturas HGVS (<http://lgdfm3.ncifcrf.gov/bic/BIC.html>).

Gene / Caso	Éxon	Alteração	Tipo	Relevância clínica
<i>BRCA2</i>				
MT- 2	10	c.1796T>C p.Ser599=	<i>Missense</i>	Desconhecida
	11	c.3396A>G p.Lys1132	Sinônima	Não
	11	c.5744C>T p.Thr1915Met	<i>Missense</i>	Desconhecida
	17	c.7982G>C*	*	*

*nomenclatura e dados ainda não descritos no HGVS.



Figura 14 - Imagem gerada pelo software *Chromosome Analysis Suite (ChAS Affymetrix)* mostrando o perfil de alterações genômicas observadas no cromossomo 7 para a paciente MT-2. A região deletada (7q22.1-q34) está representada por uma barra vermelha. A seta vermelha indica a variação na linha representativa do *Smooth Signal* (estimativa do número de cópias) revelando sinais modestos indicativos de mosaicism. A CNV é detectada pela análise da razão de \log_2 das sondas não-polimórficas e foi confirmada pela análise das sondas polimórficas (SNPs).

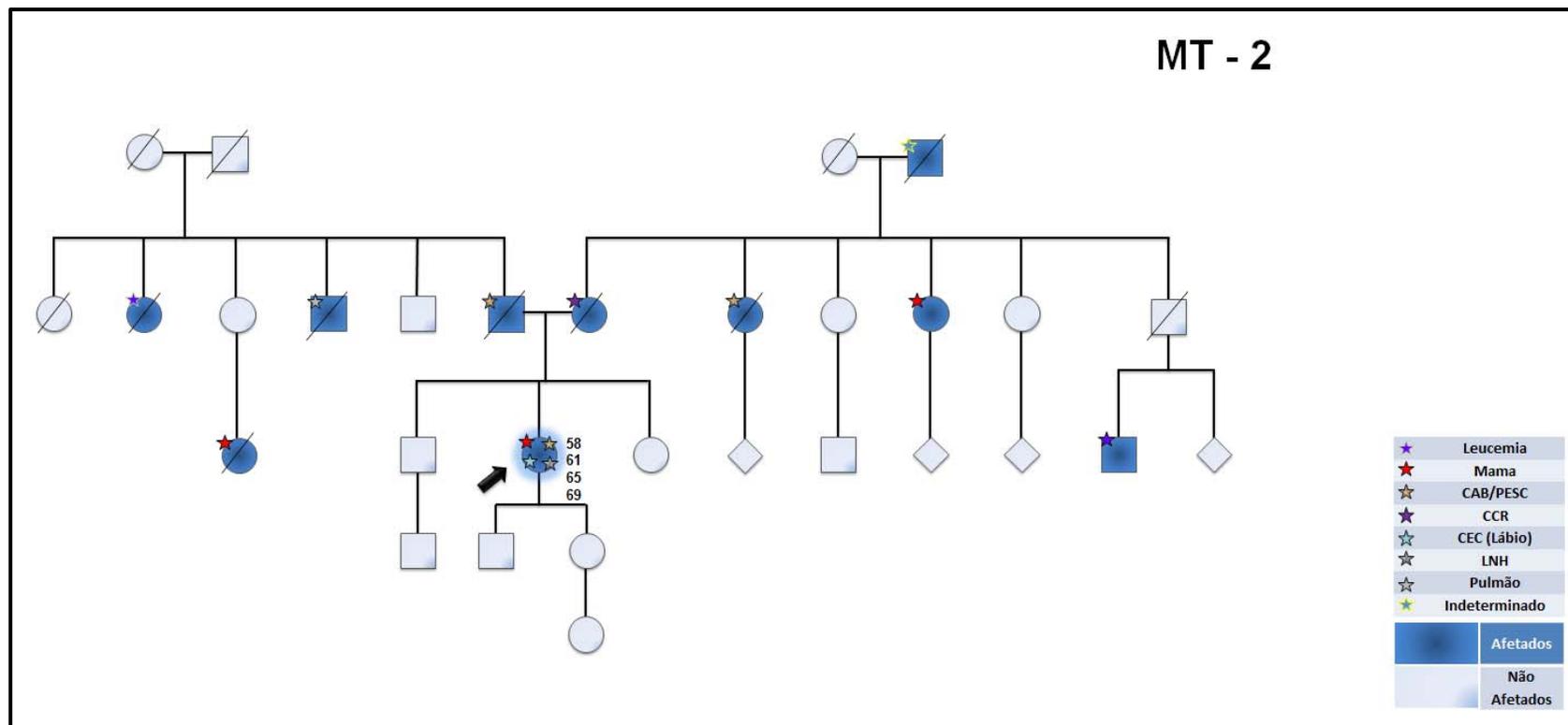


Figura 15 - A Paciente MT-2 apresentou quatro neoplasias (câncer de mama aos 58 anos linfoma não-Hodgkin aos 63 anos CEC de lábio aos 65 anos e neoplasia em órbita ocular aos 69 anos de idade). A história familiar inclui câncer colorretal (mãe) câncer de cabeça e pescoço (pai e tia materna) câncer de mama (tia materna e prima paterna) câncer indeterminado (avô materno) câncer colorretal (primo materno) câncer de pulmão (tio Paterno) e leucemia (tia paterna).

O caso MT-4 apresentou seis alterações incluindo uma cnLOH de 49 Mb na região 7q22.1 abrangendo 380 genes (Figura 16). A paciente desenvolveu duas neoplasias incluindo um melanoma aos 42 anos e carcinoma de mama aos 43 anos. A história familiar inclui irmã e tia paterna com câncer de mama. Como nesta família o carcinoma de mama também foi o tumor de maior prevalência (Figura 17), foram sequenciados os genes *BRCA1* e *BRCA2* não sendo identificadas mutações patogênicas (Quadro 11). Uma alteração de significado desconhecido foi detectada no éxon 10 do gene *BRCA2* c.1796T>C. Os três filhos da paciente MT-4 sem história positiva de neoplasias foram avaliados usando a plataforma *CytoScan HD* e não foram detectadas alterações raras ou novas raras, apenas comuns.

Quadro 11 - Alterações encontradas nos genes *BRCA1* e *BRCA2* de acordo com o banco de dados BIC e nomenclatura HGVS (<http://lgdfm3.ncifcrf.gov/bic/BIC.html>).

GENE / CASO	ÉXON	ALTERAÇÃO	TIPO	RELEVÂNCIA CLÍNICA
<i>BRCA1</i>				
MT- 4	11	c.2612C>T p.Pro871Leu	<i>Missense</i>	Não patogênica
	11	c.3113A>G p.Glu1038Gly	<i>Missense</i>	Não patogênica
	11	c.3548A>G p.Lys1183Arg	<i>Missense</i>	Não patogênica
	13	c.4308T>C p.Ser1436=	Sinônima	Não patogênica
	16	c.4837A>G p.Ser1613 Gly	<i>Missense</i>	Não patogênica
<i>BRCA2</i>				
MT-4	10	c.1114C>A p.Asn372=	<i>Missense</i>	Não patogênica
	10	c.1796T>C p.Ser599=	<i>Missense</i>	Desconhecida

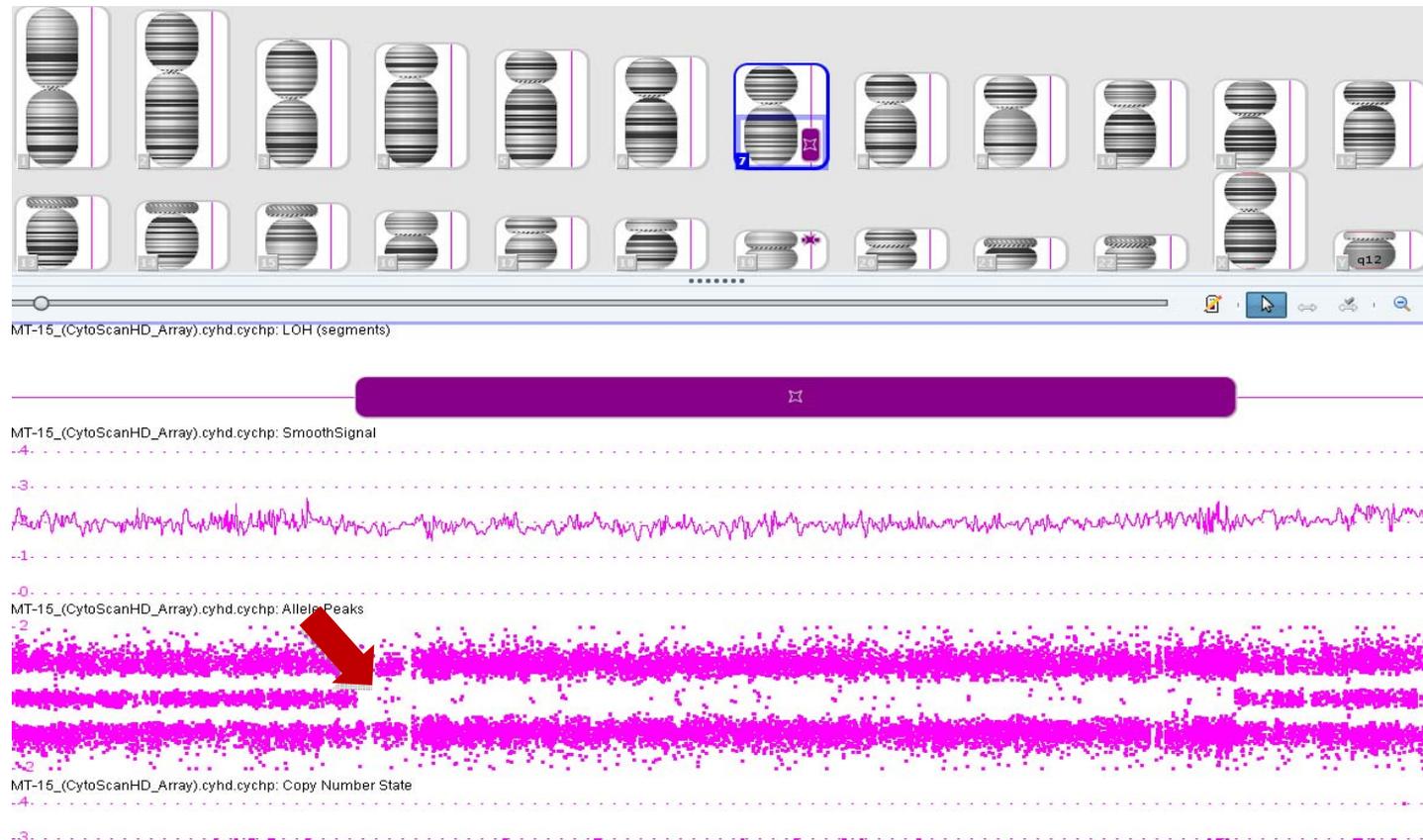


Figura 16 - Imagem gerada pelo software *Chromosome Analysis Suite (ChAS Affymetrix)*. A região de cnLOH mapeada em 7q22.1-q36.1 está representada por uma barra roxa e foi identificada pela análise das sondas polimórficas (SNPs) indicada na Figura (seta vermelha) ilustrando duas possibilidades alélicas (existência de duas linhas quando deveriam se apresentar três possibilidades alélicas como resultado dos genótipos homocigoto recessivo, heterocigose e homocigoto dominante).

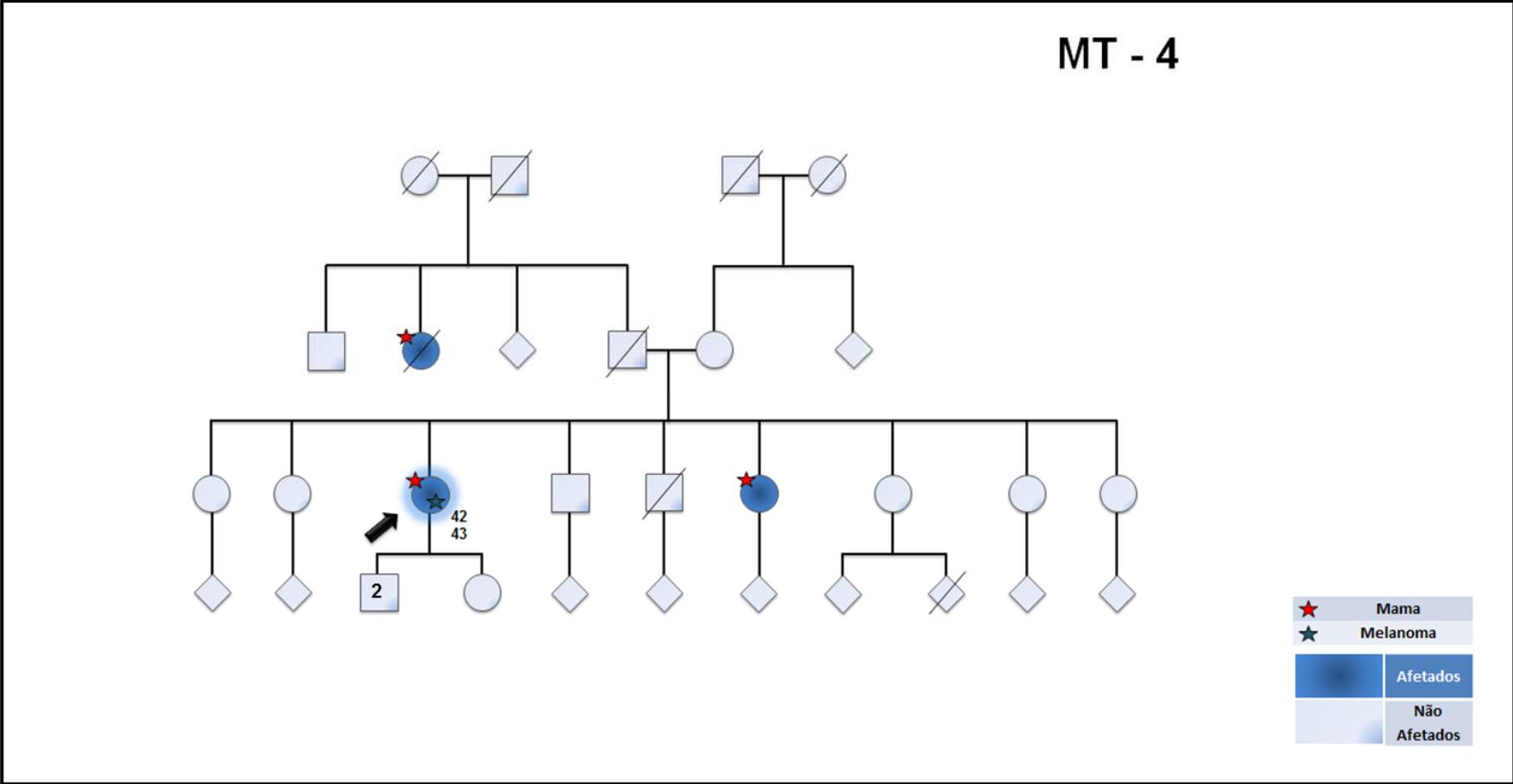


Figura 17 - Paciente MT-4 sexo feminino pertencente ao grupo de múltiplos tumores apresenta duas neoplasias melanoma aos 42 anos de idade e câncer de mama aos 43 anos. A história familiar inclui câncer de mama (irmã e tia paterna).

O caso MT-6 apresentou seis alterações sendo quatro ganhos e duas cnLOHs. Em particular o ganho em 2q34 classificado como alteração nova rara englobou o gene *ERBB4*. O paciente MT-3 apresentou nove ganhos em um total de 10 alterações sendo que o ganho em 4q13.3 envolveu cinco genes da família *CXCL* e a única perda mapeada em 6q26 abrangeu o gene *PARK2*.

Dois casos apresentaram um número elevado de cnLOHs. O caso MT-8 teve 12 alterações incluindo oito cnLOHs que abrangeram em média 121 genes e foram mapeados em seis cromossomos diferentes.

O caso MT-14 além de apresentar o maior número de alterações totais (23) também teve o maior número de cnLOHs (22, média de 22 Mb) e um ganho na região Xq27.1 (10 Kb). As cnLOHs foram identificadas nos cromossomos 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19 e X. Esta paciente, hoje com 19 anos de idade, desenvolveu duas neoplasias: leucemia linfóide aguda aos 13 anos e câncer colorretal aos 15 anos. A história familiar da paciente mostrada na Figura 18 inclui bisavô paterno com câncer de esôfago e tia paterna de segundo grau com câncer colorretal.

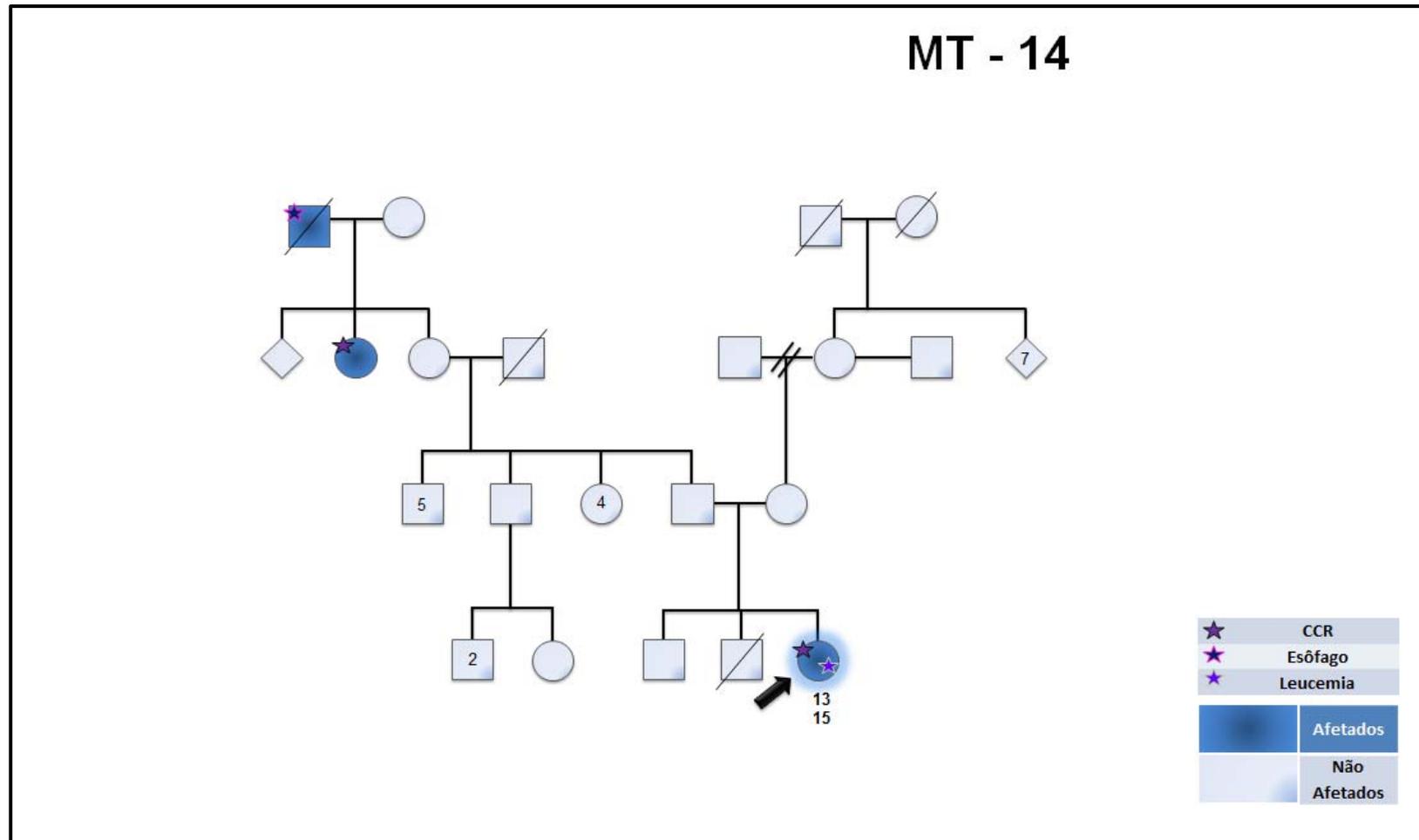


Figura 18 - A paciente MT-14 apresentou duas neoplasias (leucemia linfóide aguda aos 13 anos e câncer colorretal aos 15 anos). A história familiar da paciente inclui câncer de esôfago (bisavô paterno) e câncer colorretal (tia paterna de segundo grau).

Semelhante ao descrito nos pacientes com a síndrome de Li-Fraumeni *like*, os pacientes que apresentaram múltiplos tumores primários foram comparados a fim de verificar se eles compartilhavam as mesmas alterações raras e novas raras (Quadro 12). As regiões com cnLOHs foram excluídas da análise pelos motivos já explicados anteriormente.

Quadro 12 - Alterações genômicas compartilhadas entre os pacientes que apresentaram tumores múltiplos.

REGIÃO	INÍCIO	FIM	GENES	MT-1	MT-4	MT-14	MT-15
5p12	45980867	46365514	NA	P	P	-	-
16q24.2	88330597	88966513	ZC3H18	G	G	-	-
Xq27.1	139804656	139813756	FGF13	-	-	G	G

G: ganho; P: perda.

5.3 REGIÕES GENÔMICAS RARAS E NOVAS RARAS COMPARTILHADAS ENTRE OS CASOS PORTADORES DA SÍNDROME DE LI-FRAUMENI *LIKE* E OS CASOS COM MÚLTIPLOS TUMORES PRIMÁRIOS

Neste estudo também foram comparadas as alterações raras e novas raras entre os pacientes classificados como LFL e MT (Quadro 13). Novamente, o caso LFL-8 e regiões com cnLOHs foram excluídas desta avaliação. Foram detectadas 11 regiões cromossômicas que apresentaram CNVs em pelo menos um caso LFL e um caso MT. A região 5q31 englobou uma grande quantidade de genes, principalmente da família *PCDHB*, e foram observados ganhos em LFL-13, LFL-15 e MT-3. Foram identificados ganhos genômicos em quatro casos (LFL-10, LFL12, MT14 e MT-15)

envolvendo Xq27.1, a qual não abrangeu nenhum gene ou microRNA conhecido até o momento. Em 13q12.11 (*GJB6*, *CRYL1* e *MIR4499*) foram observadas CNVs conflitantes, sendo detectado ganho em LFL-13 e perda no caso MT-8.

Quadro 13 - Alterações genômicas (raras e novas raras) compartilhadas entre os pacientes com Múltiplos Tumores e os pacientes portadores da Síndrome de Li-Fraumeni *like*.

Região	Início	Fim	Genes	LFL-1	LFL-2	LFL-3	LFL-10	LFL-12	LFL-13	LFL-14	LFL-15	MT-1	MT-2	MT-3	MT-4	MT-6	MT-8	MT-14	MT-15		
1p36.33	2140721	2267557	<i>Clorf86</i>								G						G				
			<i>SKI</i>									G						G			
			<i>MORN1</i>									G							G		
2q34	213162299	213187551	<i>ERBB4</i>	P								P									
5q31.3	140436338	140824117	<i>PCDHB2</i>						G		G			G							
			<i>PCDHB3</i>							G		G			G						
			<i>PCDHB4</i>								G		G			G					
			<i>PCDHB5</i>								G		G			G					
			<i>PCDHB6</i>								G		G			G					
			<i>PCDHB17</i>								G		G			G					
			<i>PCDHB7</i>								G		G			G					
			<i>PCDHB8</i>								G		G			G					
			<i>PCDHB16</i>								G		G			G					
			<i>PCDHB9</i>								G		G			G					
			<i>PCDHB10</i>								G		G			G					
			<i>PCDHB11</i>								G		G			G					
			<i>PCDHB12</i>								G		G			G					
			<i>PCDHB13</i>								G		G			G					
			<i>PCDHB14</i>								G		G			G					
			<i>PCDHB18</i>								G		G			G					
			<i>PCDHB19P</i>								G		G			G					
			<i>PCDHB15</i>								G		G			G					
			<i>SLC25A2</i>								G		G			G					
			<i>TAF7</i>								G		G			G					
			<i>PCDHGA1</i>								G		G			G					
			<i>PCDHGA2</i>								G		G			G					
			<i>PCDHGA3</i>								G		G			G					
<i>PCDHGB1</i>								G		G			G								
<i>PCDHGA4</i>								G		G			G								
<i>PCDHGB2</i>								G		G			G								
<i>PCDHGA5</i>								G		G			G								
<i>PCDHGB3</i>								G		G			G								

			<i>PCDHGA6</i>						G		G			G					
			<i>PCDHGA7</i>						G		G			G					
			<i>PCDHGB4</i>						G		G			G					
			<i>PCDHGA8</i>						G		G			G					
			<i>PCDHGB5</i>						G		G			G					
			<i>PCDHGA9</i>						G		G			G					
			<i>PCDHGB6</i>						G		G			G					
			<i>PCDHGA10</i>						G		G			G					
			<i>PCDHGB7</i>						G		G			G					
			<i>PCDHGA11</i>						G		G			G					
			<i>PCDHGB8P</i>						G		G			G					
			<i>PCDHGA12</i>						G		G			G					
13q12.11	20797314	21034197	<i>GJB6</i>						G										P
			<i>CRYL1</i>						G										P
			<i>MIR4499</i>						G										P
13q12.11	23223089	23506365	<i>BASP1P1</i>						G										
16q24.2	88677498	88966513	<i>ZC3H18</i>						G										
			<i>IL17C</i>						G										
18q22.3	72763024	73024458	<i>ZNF407</i>						G					G					
			<i>ZADH2</i>						G					G					
			<i>TSHZ1</i>						G					G					
20q13.33	61786565	62066793	<i>MIR124-3</i>							G	G	G							
			<i>YTHDF1</i>							G	G	G							
			<i>BIRC7</i>							G	G	G							
			<i>MIR3196</i>							G	G	G							
			<i>NKAIN4</i>							G	G	G							
			<i>FLJ16779</i>							G	G	G							
			<i>ARFGAP1</i>							G	G	G							
			<i>MIR4326</i>							G	G	G							
			<i>COL20A1</i>							G	G	G							
			<i>CHRNA4</i>							G	G	G							
			<i>KCNQ2</i>							G	G	G							
22q13.33	50277936	50296515	<i>ZBED4</i>						G										
Xq27.1	139804656	139812952	-				G		G										G G
Xq21.2	85285777	85384788	-						G										

G: ganho; P: perda.

Foi realizada uma comparação dos genes mapeados nas regiões raras e novas raras considerando todos os casos do estudo. A principal correlação foi o envolvimento de 11 genes (*ARHGEF9*, *ASB12*, *FAM123B*, *FRMD8P1*, *LASIL*, *LOC92249*, *MSN*, *MTMR8*, *SPIN4*, *ZC3H12B*, *ZC4H2*) alterados em nove casos: MT-14 (cnLOH), LFL-8 (perda), LFL-14 (cnLOH), MT-6 (cnLOH), LFL-7 (cnLOH), LFL-2 (cnLOH), LFL-12 (cnLOH), LFL-3 (cnLOH) e LFL-6 (cnLOH).

O programa *Ingenuity Pathway Analysis* foi utilizado para avaliar todas as alterações identificadas no grupo de pacientes LFL (5.366 genes) e MT (5.906 genes). Considerando apenas processos relacionados com câncer foi observado que em pacientes LFL a maior parte das alterações foram enriquecidas significativamente para processos relacionados com câncer de cólon (932 genes, p-valor = $5,6 \times 10^{-5}$) e adenocarcinoma gastrointestinal (1.201 p-valor= $4,46 \times 10^{-5}$). Dentre os pacientes, dois (LFL-1 e LFL-13) desenvolveram CCR e outros quatro casos (LFL-2, LFL-5, LFL-9 e LFL-15) relataram esse tipo neoplasia na família. Além disso, o câncer gástrico estava presente na família de quatro pacientes (LFL-1, LFL-2, LFL-8 e LFL-15). Também foram identificados genes enriquecidos significativamente para neoplasia epitelial e neoplasia maligna do abdômen envolvendo 1.634 e 1.233 genes, respectivamente. No grupo de pacientes MT, 1.275 genes foram enriquecidos para câncer de mama (p-valor= $1,11 \times 10^{-3}$), identificado em quatro pacientes e familiares (MT-2, MT-3, MT-4 e MT-8) e também no caso MT-6 e na família do caso MT-7. Desses genes, foi observado que 485 também estavam relacionados com processos envolvendo o carcinoma de ovário (p-valor= $1,84 \times 10^{-3}$), tumor identificado no MT-15 e familiares. Os dados estão apresentados na Figura 19.

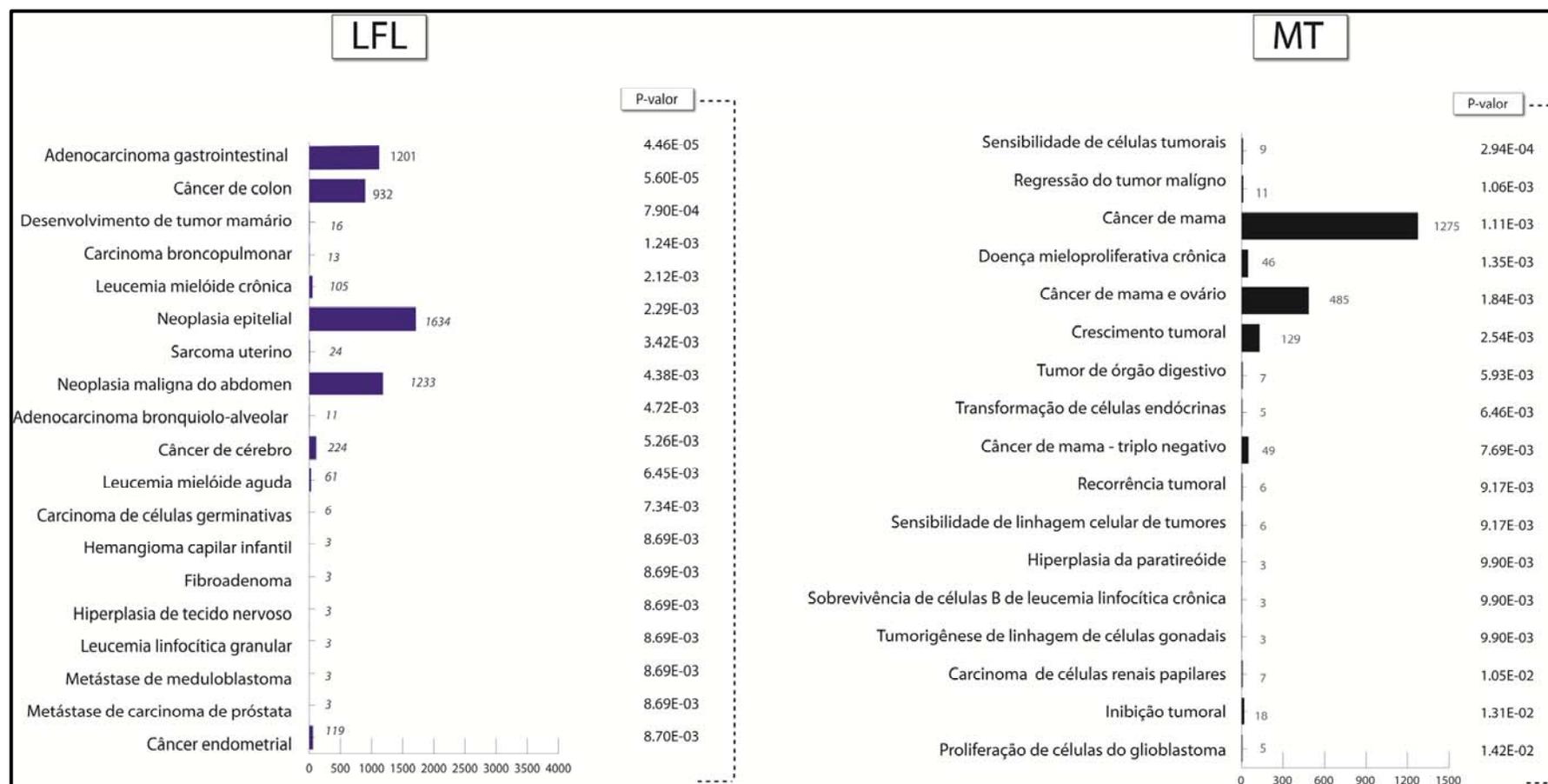


Figura 19 - Avaliação por enriquecimento gênico das alterações identificadas no grupo de pacientes Li-Fraumeni-Like e com múltiplos tumores. Foi utilizado o software *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA) e considerado apenas processos relacionados com câncer.

6 DISCUSSÃO

Um significativo número de pacientes com importante história de câncer em membros da família, apresenta mutações germinativas em genes de alta penetrância que atuam no controle do ciclo celular, o que gera um risco maior de desenvolver neoplasias ao longo da vida (TUCKER E FRIDMAN 2002; LINDOR et al. 2008; ALMEIDA e STRATAKIS 2010; CYBULSKI et al. 2011; BUERKI et al. 2012). Há várias síndromes hereditárias de câncer já descritas em literatura, entre elas a Síndrome de Li-Fraumeni e sua variante Li-Fraumeni *Like*. A LFL/LFS está associada com mutações germinativas no gene *TP53* e apresenta um padrão de herança autossômico dominante, onde o portador desenvolve várias neoplasias em idade jovem, principalmente sarcomas de partes moles, osteossarcomas, carcinomas de mama, tumores do sistema nervoso central e carcinomas adrenocorticais (LI et al. 1988; MALKIN et al. 1990).

Dados em literatura revelam que aproximadamente 70% dos pacientes portadores da LFS e 40% dos portadores da LFL apresentam mutações patogênicas no gene *TP53*, sendo este, até o momento, o único gene relacionado com a síndrome (VARLEY 2003; BACHINSKI et al. 2005; BOUGEARD et al. 2008).

O presente estudo teve como proposta avaliar alterações genômicas em pacientes com múltiplos tumores primários que apresentam a Síndrome de Li-Fraumeni *Like* e outros casos de pacientes com múltiplos tumores primários. Amostras de sangue periférico de todos os pacientes foram avaliados por sequenciamento de Sanger para todo o gene *TP53* e foram negativos para mutações

patogênicas neste gene. Portanto, a hipótese de que as mutações neste gene seriam as responsáveis pelo desenvolvimento de múltiplas neoplasias pode ser descartada.

Semelhante a este estudo, alguns pesquisadores avaliaram pacientes portadores da LFS/LFL, negativos para mutações patogênicas no gene *TP53*, com o intuito de identificar outros genes que poderiam estar relacionados com o desenvolvimento de neoplasias. VAHTERISCO et al. (2001) avaliaram 44 famílias finlandesas, classificadas como LFS/LFL e identificaram dois indivíduos de famílias diferentes com mutações germinativas no gene *CHEK2* (1100delC). Os dois pacientes apresentaram tumores de mama, porém, as neoplasias dos familiares não eram típicas da LFS. SODHA et al. (2002) identificaram três mutações no gene *CHEK2* em 26 pacientes LFS/LFL, todas não patogênicas. Segundo MALKIN (2011) as mutações em *CHEK2* não parecem ter uma grande contribuição para o fenótipo da LFS/LFL.

FINKOVA et al. (2009) avaliaram os mecanismos de regulação da expressão do gene *TP53* em famílias LFS negativas para mutações neste gene e evidenciaram que o promotor do *TP53* não é metilado nessas famílias, o que excluiu a possibilidade de efeitos epigenéticos associados ao fenótipo desta síndrome no grupo de pacientes avaliados. Os autores relataram a necessidade de estudos direcionados para esses pacientes, não só para o melhor entendimento molecular, mas também para a melhor caracterização fenotípica da síndrome.

A identificação de mutações associadas com a LFS/LFL é de fundamental importância no aconselhamento genético dos pacientes e seus familiares, pois auxilia no diagnóstico precoce, na aceitação da doença e encorajamento dos envolvidos a enfrentar as adversidades relacionadas à doença (ACHATZ, 2007). Assim, este

estudo pode contribuir para o melhor entendimento das alterações genéticas associadas com pacientes com LFS e caracterizar as alterações genômicas em pacientes com múltiplos tumores primários e história de câncer familiar.

O primeiro grupo de pacientes aqui estudado foi composto por 15 pacientes classificados de acordo com os critérios para a Síndrome de Li-Fraumeni *Like* segundo Chompret (cinco casos), Eeles 1 (oito casos) ou Eeles 2 (dois casos). O segundo grupo foi composto por 12 pacientes portadores de múltiplos tumores primários, que não se enquadravam nos critérios clínicos clássicos utilizados para o diagnóstico das síndromes hereditárias já descritos em literatura.

Foram incluídos no estudo apenas pacientes que não receberam tratamento quimioterápico e ou radioterápico pelo menos um ano anterior à coleta das amostras. Embora tenha sido exaustivamente buscados pacientes que não foram tratados por radioterapia, entre os 13 casos que foram submetidos a esse tratamento 11 casos desenvolveram outros tumores primários após o tratamento e oito casos (LFL-4, LFL-5, LFL-6, LFL-15, MT-6, MT-8 e MT-12) apresentaram entre os múltiplos tumores alguns localizados em áreas previamente irradiadas ou na sua proximidade. Três deles (LFL-4, LFL-5 e MT-12) apresentaram tumores primários coincidentes com áreas previamente irradiadas.

Relatos em literatura evidenciam que pacientes submetidos a radioterapia podem desenvolver outros tumores primários nas mesmas áreas de irradiação sendo mais prevalente em crianças e adultos jovens (NEGLIA et al. 2006; MEADOWS et al. 2009; KLEINERMAN et al. 2009; HARBRON et al. 2013). A paciente LFL-4 foi submetida à radioterapia para tratamento de um rabdomiossarcoma em membro inferior direito aos 13 anos; aos 36 anos desenvolveu um carcinoma de mama. O

paciente LF-5 tem história de retinoblastoma bilateral (1 ano e 3 anos) tratado por cirurgia, quimio- e radioterapia; aos 23 anos desenvolveu um osteossarcoma e aos 31 anos um sarcoma pleomórfico. A paciente MT-12 também tem história de retinoblastoma bilateral (2 anos) o qual foi tratado por cirurgia, quimioterapia e radioterapia e um rabdmiossarcoma de face (11 anos), também tratado por radioterapia. Assim, estes três casos eram de crianças ou pacientes jovens, concordantes com os dados da literatura.

Segundo HARBRON et al. (2013), pacientes com câncer em idade de 0 e 29 anos que foram tratados com radioterapia apresentam um risco de quase cinco vezes maior de desenvolver outra neoplasia quando comparados à população em geral na mesma faixa etária. Pacientes com a Síndrome de Li-Fraumeni que apresentam mutações no gene *TP53* também têm sido relatados como apresentando risco aumentado de desenvolver outros tumores primários em áreas tratadas previamente por radioterapia (HISADA et al. 1998; NUTTING et al. 2000; EVANS et al. 2006; SALMON et al. 2007; HEYMANN et al. 2010). Um outro aspecto do grupo amostral avaliado é que todos os pacientes, exceto dois (LFL-4 e MT11), têm história de outros familiares afetados por câncer. Em adição, apenas dois pacientes morreram, os demais estão vivos e em seguimento clínico.

As CNVs podem englobar inúmeros genes e estas variações podem ocorrer como evento *de novo* ou serem herdadas (OSTROVNAYA et al. 2010). Estas variantes estruturais representam uma importante fonte de variabilidade da população (SHELLING e FERGUSON 2007; XU et al. 2011) além de terem potencialidade para alterar a dosagem de transcritos ou alterar as regiões proximais ou a distância de regiões reguladoras desses genes. Algumas CNVs foram identificadas como sendo

funcionais, tendo portanto importância em várias doenças humanas. O objetivo deste estudo foi identificar alterações novas ou novas raras que pudessem estar associadas à história familiar de câncer e à presença de múltiplos tumores primários nestes pacientes.

Um dado relevante é que genes contidos em uma CNV patogênica podem ser candidatos a estarem associados com um genótipo clínico correspondente. Contudo, alguns genes dentro de uma CNV podem não ser necessários ou essenciais para causar determinado fenótipo (SHLIEN and MALKIN, 2010). Além disso, as CNVs comuns são frequentemente encontradas na população saudável, embora um estudo tenha demonstrado que algumas das CNVs comuns podem incluir genes associados com câncer, podendo estar envolvidos nos processos iniciais da carcinogênese (SHLIEN et al., 2008).

Todos os casos do estudo (27), o filho da paciente MT-2 e três filhos da paciente MT-4 foram avaliados para alterações genômicas, incluindo ganhos, perdas e cnLOH. As CNVs comuns não foram avaliadas em detalhes. A razão para essa exclusão foi o critério adotado para considerar uma CNVs como potencialmente patogênicas por meio da comparação com vários bancos de dados.

Para identificar se estas alterações presentes em cada caso em particular eram comuns ou raras/novas raras foram utilizados o *Database of Genomic Variants* (DGV, <http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>) e três bancos de dados construídos a partir de amostras investigadas na mesma plataforma que nós utilizamos e que foram cedidos pela Dra. Sarah South, *Department of Pathology, Utah University*, EUA. Além disso, também foi utilizado um banco de dados construído a partir dos

resultados de aCGH em amostras de indivíduos saudáveis da população brasileira (KREPISCHI et al. 2012).

No grupo de pacientes LFL foram detectadas 76 alterações classificadas como novas raras e 146 raras. Entre os pacientes MT, foram observadas 15 alterações novas raras e 67 raras. Essa diferença é decorrente possivelmente do perfil genômico detectado no caso LFL-8, onde foi observado um grande número de anormalidades (109 alterações raras e novas raras), sendo 45 ganhos (tamanho médio de 62 Kb), 58 perdas (com média 129 Kb) e seis alterações em mosaicismo incluindo a perda de um cromossomo X.

Um dos estudos pioneiros que avaliou CNVs em pacientes com a LFS, investigou estas alterações em 20 pacientes LFS negativas para mutação no gene *TP53* e 33 portadores da mutação. Os autores relataram que portadores de mutações em *TP53* apresentavam um número estatisticamente maior de CNVs quando comparados aos pacientes com *TP53* selvagem (SHLIEN et al. 2008), entretanto, a comparação com bancos de dados de CNVs foi limitada (baseada no *National Center for Biotechnology Information build 35 reference human genome sequence*). Além disso, os autores descreveram uma CNV no gene *MLLT4* (um alvo de Ras que regula a adesão célula a célula) sendo sugerido como associado com a LFS. Em nosso estudo, não foram detectadas alterações neste gene. Interessantemente, os autores excluíram de suas análises duas amostras do grupo de pacientes portadores da mutação em *TP53* que apresentaram mais de 150 CNVs (SHLIEN et al. 2008), semelhante a um dos casos do presente estudo (LFL-8, uma paciente que era mosaico 45,X/46,XX).

TABORI et al. (2010) analisaram o perfil genômico de 64 pacientes portadores de mutações no gene *TP53* (22 carcinomas do plexo coróide e 42 papilomas do plexo coróide). Os pacientes portadores de carcinomas apresentaram um número maior de CNVs quando comparados com os pacientes com papilomas. Ao realizarem a comparação desses pacientes com carcinomas do plexo coróide com um grupo controle de 50 indivíduos não mutados para *TP53* observaram que os pacientes com mutações apresentam um número de CNVs extremamente alto.

Além de perdas e ganhos genômicos, também foram identificadas as alterações denominadas cnLOH. No grupo de pacientes LFL, foram identificadas 55 cnLOH raras, as quais foram distribuídas por quase todos os cromossomos, mas foram detectadas em maior frequência no cromossomo X. Entre os casos LFL, o número de cnLOH variou de zero a 28, sendo mais frequentemente detectadas no caso LFL-11 (28 cnLOH, envolvendo 16 cromossomos e em média 119 genes) e LFL-14 (14 cnLOH, envolvendo 9 cromossomos e, em média, 48 genes).

A paciente LFL-11 tem história de carcinoma de colo uterino (41 anos) e de pâncreas (51 anos). A paciente LFL-14 apresentou um carcinoma de células escamosas de língua (73 anos), carcinoma de tireoide (74 anos) e de endométrio (77 anos). Além do grande número de cnLOH, estes dois pacientes apresentaram um número limitado de perdas e ganhos genômicos. Estudos em carcinomas colorretais demonstraram um aumento de cnLOH e uma redução de perdas e ganhos genômicos, entretanto o significado destas alterações não é conhecido (LIPS et al., 2008; MIDDELDORP et al., 2012).

Entre os pacientes MT foram identificadas 36 cnLOH as quais estavam distribuídas em 18 cromossomos. Dois casos apresentaram um limitado número de

perdas e ganhos genômicos e um grande número de cnLOH, o MT-8 (8 cnLOH, tamanho médio de 9.7 Mb, envolvendo 968 genes) e o caso MT-14 (22 cnLOH, tamanho médio de 22Mb, envolvendo 3656 genes), embora essa tenha também sido uma característica do grupo de pacientes MT. As cnLOHs podem levar a inativação de genes supressores tumorais ou a ativação de oncogenes, propiciando assim o desenvolvimento de neoplasias (LAPUNZINA e MONK 2011). O significado destas alterações ainda precisa ser melhor avaliado e novos estudos são necessários para definir o envolvimento de genes mapeados nestas grandes regiões de cnLOH.

Há um número muito limitado de estudos que avaliaram alterações genômicas em pacientes com a Síndrome de Li-Fraumeni ou suas variantes. Recentemente, AURY-LANDAS et al. (2013) investigaram amostras de sangue periférico de 64 pacientes (25 homens e 39 mulheres), os quais foram classificados como portadores da LFL e preencheram os critérios de Chompret. Os autores utilizaram a plataforma 180K *array CGH* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) e compararam os achados com os dados de 10 amostras de referência e com o banco de dados DGV. Nesse estudo, 21 CNVs não estavam descritas no banco de dados do DVG incluindo perdas em 1p36.12 (23,244,421–23,562,102). Nesta mesma região, nós detectamos uma cnLOH no caso MT-14. A perda em 2p15 (61,978,338 - 62,094,667) foi também detectada no caso LFL-8 do nosso estudo, embora de menor tamanho (61,344,545 - 61,392,12). Outras regiões genômicas descritas pelos autores como alteradas, incluindo 2p15, 3p14.1, 6p21.31 coincidem com as encontradas principalmente no caso LFL-8, embora não estivessem mapeadas precisamente nas mesmas subregiões (considerando o início e fim de cada uma delas). Os autores também relataram alterações envolvendo o cromossomo X incluindo ganho em

Xq13.1 concordante com a cnLOH detectada no caso LFL-14. Assim, estas alterações podem ter relevância clínica e necessitam ser validadas em outros membros das famílias. Vale ressaltar que o nosso estudo utilizou uma plataforma de maior densidade do que a descrita por AURY-LANDAS et al. (2013) e que várias alterações não relatadas anteriormente em literatura foram aqui descritas. Tais alterações precisam ser validadas e, se confirmadas, estas alterações podem ser úteis para o aconselhamento genético das famílias.

Um dos achados interessantes deste estudo foi o encontrado no caso LFL-8, o qual apresentou um grande número de alterações genômicas. Esta paciente foi diagnosticada como portadora da síndrome de Turner em mosaicismo. A grande maioria das células apresentava a linhagem 45,X (73,6% das células). Além desta alteração envolvendo o cromossomo X foram detectadas inúmeras alterações, como descrito acima. Interessantemente, esta paciente não apresentava os estigmas da Síndrome de Turner sendo este achado não esperado. Recentemente, HOOK e WARBURTON (2014) em uma revisão sobre a Síndrome de Turner concluíram que todos os indivíduos 45,X com a Síndrome de Turner são mosaicos; que a ausência de um cromossomo X em embriões 45,X é causada primariamente por fatores mitóticos e que a placenta é um forte candidato para a localização de uma linhagem auxiliar em indivíduos aparentemente não mosaicos 45,X.

As primeiras descrições clínicas completas da Síndrome de Turner foram realizadas em 1930 pelo médico alemão Otto Ullrich em uma menina de oito anos e em 1938 pelo médico americano Henry Turner em sua esposa. Em ambos os casos, os pesquisadores notaram algumas características clínicas, como baixa estatura, seios pequenos e poucos pêlos pubianos (JACOBS et al. 1997). Esta alteração genética é

uma das mais comuns em mulheres, sendo identificada em uma de cada 2000 recém-nascidas (STOCHHOLM et al. 2006). Em literatura, a Síndrome de Turner foi associada principalmente com um risco aumentado de desenvolver gonadoblastomas (SCHOEMAKER et al. 2008).

Para o nosso conhecimento, há dois relatos em literatura de pacientes com a LFS e a Síndrome de Turner. PIVNICK et al. (1998) identificaram uma mutação patogênica em *TP53* e perda total do cromossomo X em uma paciente de 20 meses de idade com déficit de crescimento, complicações cardíacas, carcinoma adrenocortical e ganglioneuroblastoma. A história familiar da menina mostrou tumores de cólon e próstata em três gerações diferentes e em indivíduos jovens. Em um outro estudo foram detectadas mutações no gene *TP53* em três meninas e dois meninos com carcinomas de plexo coróide, sendo que uma menina também foi diagnosticada com a Síndrome de Turner aos 10 anos de idade (KRUTILKOVA et al. 2005). PAULO SOVA et al. (2011) avaliaram o sêmen de dois paciente do sexo masculino portadores de mutações germinativas em *TP53* e observaram um aumento de aneuploidias, envolvendo principalmente os cromossomos sexuais, quando comparados com quatro indivíduos controle. Estes resultados sugerem que mutações germinativas em *TP53* podem explicar o diagnóstico de mulheres com LFS e Síndrome de Turner. Entretanto, para o nosso conhecimento não foram relatadas pacientes com a Síndrome de Turner e Li-Fraumeni na ausência de mutação no gene *TP53*.

O caso LFL-4 não apresentou nenhuma alteração genômica considerada rara ou nova rara, apenas duas alterações comuns. A análise detalhada do heredograma da paciente mostrou que apenas ela apresentou câncer ao longo da vida

(rabdomyossarcoma aos 13 anos de idade e câncer de mama aos 36 e 38 anos de idade). A paciente foi categorizada como tendo LFL pelo critério modificado de Chompret, que engloba pacientes com várias neoplasias, sendo até duas do espectro da LFS antes dos 45 anos de idade. Este caso é indicado para análise de sequenciamento de alto desempenho com o objetivo de identificar novas mutações que poderiam explicar o achado de múltiplos tumores.

O caso LFL-5 apresentou uma CNV nova rara (ganho) em 6q25.3 envolvendo quatro genes (*IGF2R*, *AIRN*, *LOC729603* e *SLC22A1*). A probanda tinha história familiar de câncer gástrico (avô paterno), câncer de pulmão (tia materna de 2º grau) e tumor de sistema nervoso central (prima materna de 2º grau). O gene *IGF2R*, codifica o receptor para o IGF2 e da manose 6-fosfato. Este receptor funciona no tráfego intracelular das enzimas lisossômicas, na ativação do IGF beta e degradação do IGFL2. O *IGF2R* foi descrito com expressão aumentada em tecidos fetais e no tumor de Wilms (YOTOVA et al. 2008). Ao contrário, a perda da manose 6-fostato/*IGF2R* foi relatada como associada aos carcinomas de mama, embora tenha sido recentemente sugerido que o silenciamento por si só é insuficiente para conferir o fenótipo tumoral mas que esta alteração pode contribuir para o processo tumoral em células transformadas (CAIXEIRO et al. 2013).

O caso LFL-10 apresentou perdas em 9p23 (gene *LINC00583*) e 11p14.2 (*FIBIN* e *BBOX1*). Este caso apresenta um histórico extenso de câncer na família: mãe com tumor de útero, pai e três tios com tumor de próstata, tio materno com câncer de estômago, prima materna com tumor de pâncreas, primo materno com câncer indeterminado, primo materno com câncer de pulmão e primo materno de

2º grau com tumor de sistema nervoso central. Para o nosso conhecimento não há dados em literatura envolvendo esses genes em cânceres humanos.

Como descrito anteriormente, o caso LFL-11 apresentou 31 alterações, incluindo o maior número de cnLOHs (28) entre todos os casos avaliados. Em particular, as cnLOHs em 17q11.1 e Xq12 abrangeram um grande número de genes, com 499 e 455 respectivamente. Além disso, a paciente apresentou uma única região com perda genômica em 6q12 abrangendo o gene *BAI3*, o qual faz parte da cadeia de inibidores de angiogênese e foi associado com tromboembolismo precoce (ANTONI et al. 2010). KAN et al. (2010) avaliaram 441 tumores e identificaram mutações somáticas frequentes em 77 genes, incluindo o *BAI3*. Notavelmente, mutações neste gene foram observadas em um número significativo de tumores de pulmão (13% nos carcinomas e 5% nos adenocarcinomas). Um recente estudo baseado no perfil de expressão gênica demonstrou que a proteína BAI3 é um marcador capaz de diferenciar carcinomas de células pequenas de pulmão de carcinomas de grandes células neuroendócrinos de pulmão (BARI et al, 2013). Este gene pode contribuir para o risco aumentado de múltiplos tumores nesta paciente ou pode estar associado com risco aumentado de tromboembolismo. Outros estudos são necessários inclusive para avaliar em detalhes os genes presentes nas cnLOH detectados nesta paciente.

Entre todas as CNVs raras e novas raras detectadas nos casos LFL, apenas a perda em 4q13.2 (69333761-69584322) no caso LFL-1 foi identificada em homozigose. Esta região abrange o gene *TMPRSS11E*, cuja expressão diminuída foi observada em carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço (LANG e SCHULLER 2001). No grupo MT também foi observada uma única perda em homozigose no caso MT-11 (11p15.4, 748221-5844861), envolvendo o gene

OR56B1, que pertence à família dos receptores olfativos. Possivelmente essa é uma alteração associada com uma característica comum e não associada com câncer.

Do total de perdas raras e novas raras detectadas nos grupos LFL e MT, 47 englobaram apenas um gene. Pesquisa detalhada destas alterações revelou que apenas as perdas em 8q24.11 (*EXT1*) e 22q13.2 (*EP300*), presentes no caso LFL-8, abrangeram genes descritos como supressores tumorais. O gene *EXT1* foi associado com múltiplos osteocondromas (SZUHAI et al. 2011) e o gene *EP300* foi relacionado o remodelamento da cromatina, câncer colorretal e câncer gástrico (HUH et al. 2013; DELVECCHIO et al. 2013; KIM et al. 2013). Assim, esses dois genes podem ter contribuído com o risco de desenvolvimento de múltiplos tumores nesta paciente mosaico para a Síndrome de Turner.

Quando foram comparadas todas as alterações genômicas detectadas nos pacientes LFL, foi verificado que alguns casos compartilhavam as alterações raras e novas raras. Um exemplo disso, foi o ganho do gene *IGF1R* (15q26.3) (nova rara), detectado nos casos LFL-1 e LFL-8. Este receptor tem atividade tirosina quinase e se liga com alta afinidade no IGF1. O IGF1 tem papel crítico em eventos de transformação celular. O *IGF1R* tem expressão muito alta na maioria dos tecidos malignos onde atua como um agente anti-apoptótico alterando a sobrevivência da célula.

Considerando o grande número de alterações detectadas no caso LFL-8 e por se tratar de uma paciente que sobrepõe fenótipos (S. Turner e LFL), ela foi excluída dos demais para a comparação entre as alterações presentes na casuística de LFL. Entre as cnLOHs, foram identificadas regiões que se sobrepõem, sendo elas: o ganho em 2p25.3 o qual foi detectado nos casos LFL-10 e LFL-14, os dois pacientes tinham

carcinoma de endométrio, embora não tenha sido descrito, até o momento, genes mapeados nessa região.

Os casos LFL-1 e LFL-14 apresentaram ganhos em 2p25.3 envolvendo três genes (*SH3YLI*, *ACPI* e *FAM150B*). Os dois casos apresentavam história de câncer de tireoide na família.

Os casos LFL-9 e LFL-12 apresentaram a perda em 2p22.3 (até o momento não são conhecidos genes nessa região) e os dois pacientes apresentavam câncer de mama. Foi também detectada ganhos em 2q31.1 (envolvendo nove genes *EVX2*, *HOXD13*, *HOXD12*, *MTX2*, *MIR10B*, *HOXD4*, *HOXD3*, *HOXD1* e *HOXD-AS1*), nos casos LFL-1 e LFL-5. Quando analisados na ferramenta GSEA (*Gene Set Enrichment Analysis*; (<http://www.broadinstitute.org/gsea/index.jsp>), verificou-se que o gene *HOXD1* pertence a família dos fatores de transcrição.

Entre os casos com LFL foram identificados 387 microRNAs, todos mapeados em regiões consideradas raras e novas raras. Nos casos MT foram detectados 314 microRNAs em regiões de CNVs raras. Ao utilizarmos a ferramenta de enriquecimento GSEA não foi possível agrupar estes microRNAs em funções celulares específicas.

Vários estudos recentes são encontrados em literatura quanto a função dos microRNAs e seu envolvimento em neoplasias como câncer cervical, câncer de mama, leucemia, tumores pancreáticos, tumores renais, câncer de ovário, entre outros (GÓMEZ-GÓMEZ et al. 2013; LEE et al. 2013; PETROVIĆ et al. 2014; SHARIFI et al. 2014; PRIOR et al. 2014; CHAN et al. 2014). Assim, é possível que estes miRNAs contribuam para o risco aumentado de múltiplos tumores nestes pacientes.

Os pacientes LFL-1 e LFL-7 apresentaram perda em 4q13.2 com o envolvimento do gene *TMPRSS11E/DESC1*, os dois casos tem história familiar de câncer de tireoide. O gene *TMPRSS11E/DESC1* foi relacionado com a diferenciação celular e descrito como envolvido em diminuição da expressão em carcinomas de cabeça e pescoço (LANG AND SCHULLER 2001; VILORIA et al. 2007).

Os casos LFL-13 e LFL-15 apresentaram ganhos em 5q31.3. Embora estes pacientes não apresentassem os mesmos tipos tumorais, os membros da família do caso LFL-15 tem história de câncer colorretal, se sobrepondo ao probando do caso LFL-13, que também teve o desenvolvimento do câncer colorretal. Em 5q31.3 estão mapeados 41 genes entre eles o cluster beta da protocaderina (*PCDHB1*, *PCDHB2*, *PCDHB3*, *PCDHB4*, *PCDHB5*, *PCDHB6*, *PCDHB17*, *PCDHB7*, *PCDHB8*, *PCDHB16*, *PCDHB9*, *PCDHB10*, *PCDHB11*, *PCDHB12*, *PCDHB13*, *PCDHB14*, *PCDHB18*, *PCDHB19P*, *PCDHB15*), o cluster gama da protocaderina (*PCDHGA1*; *PCDHGA2*; *PCDHGA3*, *PCDHGB1*, *PCDHGA4*, *PCDHGB2*, *PCDHGA5*, *PCDHGB3*, *PCDHGA6*, *PCDHGA7*, *PCDHGB4*, *PCDHGA8*, *PCDHGB5*, *PCDHGA9*, *PCDHGB6*, *PCDHGA10*, *PCDHGB7*, *PCDHGA11*, *PCDHGB8P* e *PCDHGA12*) e os genes *SLC25A2* e *TAF7*.

Os cluster beta e gama da protocaderina são dois dos três clusters ligados em tandem no cromossomo 5. A organização genômica sugere que estes genes podem estar envolvidos no controle da regulação e expressão gênica. Cada produto gênico contem seis domínios extracelulares da caderina uma cauda citoplasmática que diverge dos membros da superfamília da caderina. A função específica destes genes de um exon ainda não é conhecida mas acredita-se que estes genes tenham um papel crítico no estabelecimento e função de conexões neurais célula a célula (RefSeq,

2008). Em tumor de Wilms foi relatado que estes genes são silenciados por metilação (DALLOSSO et al. 2009). Os autores demonstraram que os genes *PCDH* regulam negativamente a via canônica de sinalização Wnt sendo candidatos a supressores de tumor. Assim, é possível que a perda destes genes contribua para o fenótipo tumoral nestes pacientes.

Os outros dois genes mapeados em 5q31.3 e que se encontravam alterados foram o *TAF7* e *SLC25A2*. O *TAF7* é um componente do complexo TFIID o qual atua nas primeiras etapas do controle da transcrição. Ele interage e regula a atividade enzimática dos fatores de transcrição que regulam a progressão da RNA polimerase II. A função de início da transcrição é consistente com um papel essencial de *TAF7* na proliferação celular (GEGONNE et al. 2013).

Ganhos em 16q24.2, envolvendo os genes *ZC3H18* e *IL17C*, foram detectados nos casos LFL-2 e LFL-13. Estes casos apresentaram, em comum, neoplasias renais. Alterações no gene *ZC3H18* foram associados com a progressão da neutropenia congênita severa a leucemia mielóide aguda (BEEKMAN et al. 2012). O gene *IL17C* foi encontrado com expressão aumentada no epitélio intestinal de pacientes com colite ulcerativa (IM et al. 2012).

Os casos LFL-14 e LFL-15 apresentaram ganhos em 20q13.33, envolvendo 8 genes (*YTHDF1*, *BIRC7*, *NKAIN4*, *FLJ16779*, *ARFGAP1*, *COL20A1*; *CHRNA4* e *KCNQ2*). O gene *BIRC7* já foi relatado como associado com câncer de mama e osteossarcoma (LI F. et al. 2013; LI X. et al. 2013). Na mesma região alterada também foram identificados três miRNAs: miRNA24-3, miRNA3196 e miRNA4326. O miRNA24-3 tem uma função anti-proliferativa independente do gene *TP53* e sua desregulação foi associada com câncer colorretal (MISHRA et al. 2009).

Os casos LFL-10 e LFL-13 apresentaram ganhos em Xq12 e Xq27.1. Essas regiões não apresentam, até o momento, genes conhecidos.

Para o nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que avalia alterações genômicas em pacientes com múltiplos tumores e história de câncer na família. Assim, este estudo tem potencial para identificar genes relacionados ao risco de desenvolvimento de tumores e contribuir para o aumento do conhecimento na área. Embora estes pacientes não se enquadrem nos critérios clássicos das síndromes hereditárias conhecidas como associadas com o câncer, não pode ser descartada a possibilidade de que um novo perfil genético esteja associado com o risco de desenvolvimento de múltiplos tumores.

No grupo de pacientes MT foram detectadas 15 alterações novas raras e 67 alterações raras. A comparação entre o número de CNVs raras e novas raras com o grupo de pacientes LFL (76 novas raras e 146 raras) revelou que os pacientes MT apresentavam um número muito inferior de alterações estruturais. KREPISCHI et al. (2012) compararam as CNVs detectadas em um grupo de mulheres que se enquadravam nos critérios clínicos da síndrome hereditária do câncer de mama mas que não apresentavam mutações patogênicas nos genes *BRCA1* e *BRCA2* e compararam os dados com um grupo controle composto por 100 mulheres saudáveis. Os autores verificaram que o número médio de alterações por genoma não foi diferente em ambos os grupos estudados, mas relataram um número proporcionalmente maior de CNVs raras (26) nos 68 pacientes com câncer quando comparados com o grupo controle (23), sendo que algumas dessas CNVs continham genes associados com o desenvolvimento de neoplasias.

Embora o estudo o KREPISCHI et al. (2012) tenha sido realizado na plataforma de 180K (Agilent Technology) e com uma abordagem diferente, nós encontramos um número significativamente maior de CNVs nos casos aqui estudados.

Em dois casos do grupo MT (MT-2 e MT-4) as probandas desenvolveram o câncer de mama, sendo este também observado em seus familiares. Para eliminar a hipótese que esses casos seriam positivos para mutações germinativas em genes de predisposição hereditária ao câncer de mama (*BRCA1* e *BRCA2*) foi realizado o sequenciamento pelo método de *Sanger* nas duas pacientes. Não foram identificadas mutações patogênicas e com relevância clínica nos dois casos.

Entre os achados deste estudo, dois casos específicos do grupo MT (MT-2 e MT-4) apresentaram alterações genômicas que abrangeram um grande segmento em 7q. As duas pacientes desenvolveram carcinoma de mama. O caso MT-2 apresentou uma deleção de 42 Mb em 7q22.1-q34 em mosaïcismo envolvendo 268 genes. O caso MT-4 apresentou uma cnLOH de 49Mb em 7q22.1-q36.1, abrangendo 380 genes. Vale ressaltar que a região deletada do caso MT-2 está contida na região com cnLOH do caso MT-4. Interessantemente, os filhos das pacientes MT-2 (um) e MT-4 (três) avaliados pela mesma estratégia metodológica não apresentaram CNVs raras ou novas raras e também não tinham história de câncer prévia ou atual.

Alterações em 7q, principalmente envolvendo o gene *RELN*, sendo este também encontrado nas alterações em ambos os casos foram associados com o autismo, um distúrbio neurológico que afeta o desenvolvimento emocional e social dos pacientes, cujos sintomas mais comuns são: comunicação verbal limitada ou ausente, dificuldade de interação social e padrões ritualizados de comportamentos

(BAILEY et al. 1998; RISCH et al. 1999; PERSICO et al. 2001; PERSICO e BOURGERON 2006; YANG e GILL 2007; LI et al. 2011). Nenhum dos casos apresentava distúrbios neurológicos.

Amplificações em 7q, identificadas por *CGH-array*, também foram associadas com neoplasias de células não-pequenas de pulmão e gliomas (DEHAN et al. 2007; IDBAIH et al. 2007). Ao contrário desses estudos, os casos MT-2 e MT-4 apresentaram perdas genômicas em 7q22.1 e desenvolveram uma grande variedade de tumores como carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço, linfoma não Hodgkin, neoplasia de órbita, melanoma e carcinoma de mama (presente nas duas pacientes).

A deleção em 7q31.6, envolvendo o gene *EZH2*, foi associada com a Síndrome Mielodisplásica (NIKOLOSKI et al. 2010). Por outro lado, deleções em 7q22.1 foram identificados em mais da metade de pacientes com linfoma de Hodgkin, assim como em pacientes com neoplasias mielóides, neste caso envolvendo mais especificamente o gene *CUX1* (ROBLEDO et al. 2011; MEGAN et al. 2013). Pesquisa detalhada em literatura não revelou relatos de alterações em 7q em pacientes com LFS/LFL negativos para mutações patogênicas no gene *TP53*. Entretanto, RUDERFER et al. (2013), em uma análise de 3518 pacientes com esquizofrenia e 4238 controles e utilizando a plataforma SNP array (Affymetrix 5.0 e 6.0), relataram um paciente com esquizofrenia com uma grande deleção (>10Mb) em 7q22.1 (61.512.866 –158.819.766). Essa região envolvida em perda nesse caso contém a perda genômica (99.335.985 -147.993.896) e a cnLOH (99.335.985 – 147.993.896) descrita nos dois pacientes do nosso estudo. Para o nosso conhecimento, nenhum dos pacientes do presente estudo apresentava tal fenótipo e

também desconhecemos se o caso do estudo de RUDERFER et al. (2013) tinha história de tumores múltiplos. Desta forma, este é um achado extremamente interessante que pode estar associado com o risco de desenvolvimento de múltiplos tumores.

As alterações classificadas como cnLOHs foram encontradas em um grande número de casos (6 dos 15 MT) e em alguns deles englobando quase todos os cromossomos (como o caso MT-14).

As cnLOH são definidas como perda de heterozigose sem variação no número de cópias e podem ser resultado de dissomia uniparental (quando os dois alelos são herdados de apenas um progenitor) ou podem ser eventos adquiridos pelo tumor, quando a perda de um alelo é compensada pela duplicação do outro alelo (KRYH et al., 2011). Assim, essas alterações podem levar a homozigose de genes supressores tumorais, por exemplo, o que pode predispor ao desenvolvimento de tumores. Relatos em literatura mostraram que as cnLOHs estão presentes em vários tumores e se localizam em regiões que contém genes que predisõem ao desenvolvimento de neoplasias (GRAND et al., 2009; BULLINGER et al., 2010; LAPUNZINA e MONK 2011).

A comparação das regiões alteradas no grupo MT, excluindo as cnLOHs revelou três regiões presentes em dois casos, sendo uma perda em 5p12 (sem genes conhecidos) e ganho em 16q24.2 (*ZC3H18*) nos casos MT-1 e MT-4. Os probandos não apresentam neoplasias em comuns, mas o caso MT-1 tem história de melanoma na família e caso MT-4 teve também um melanoma. Não há dados disponíveis em literatura sobre o gene *ZC3H18* (*zinc finger CCCH-type containing 18*), mas ele é muito conservado entre diferentes espécies.

Ganho em Xq27.1, onde se mapeia o gene *FGF13*, foi observado nos casos MT-14 e MT-15. O probando MT-14 apresentou câncer colorretal e o caso MT-15 tinha história de câncer colorretal em membros de sua família. O *FGF13* é pertencente à família citocinas e fatores de crescimento, membros da família do *FGF* os quais estão envolvidos em uma variedade de processos celulares como sobrevivência celular, desenvolvimento embrionário, crescimento celular, reparação de tecidos, crescimento de tumores, invasão celular entre outros.

Entre os 12 casos do grupo MT, o carcinoma de mama apareceu como o mais frequente (5 pacientes). Realizando um enriquecimento gênico pelo IPA para avaliar a relação dos genes alterados associados com câncer, o carcinoma de mama apareceu como o mais importante. Estes dados revelam que um significativo número de pacientes apresentou CNVs envolvendo genes já descritos como associados com o câncer de mama. Em conjunto com alguns estudos da literatura (SHLIEN et al., 2008; KREPISCHI et al. 2012) estes resultados sugerem que alterações estruturais envolvendo genes relacionados com câncer podem ter um papel direto na predisposição hereditária ao desenvolvimento de tumores.

O caso MT-3 apresentou ganhos envolvendo cinco genes pertencentes à família ZNF (*ZNF107*, *ZNF138*, *ZNF273*, *ZNF407*, *ZNF516*), que transcrevem proteínas regulatórias constituídas de, pelo menos, um domínio *zinc finger*. Essas proteínas atuam na transcrição gênica, tradução, transporte de mRNA, organização do citoesqueleto celular, desenvolvimento epitelial, adesão celular, dobramento de proteínas, remodelação da cromatina e detecção de zinco (LAITY et al. 2001). Para o nosso conhecimento não há estudos que mostram a relação de alterações envolvendo esses genes e o desenvolvimento de tumores. No entanto, KAMINSKY et al. (2011)

descreveram uma associação entre ganhos nas regiões onde se encontram especificamente estes cinco genes em pacientes com retardo mental.

A comparação entre os LFL e MT, excluindo o caso LFL-8 e as regiões com cnLOHs, revelou 11 regiões compartilhadas em pelo menos dois casos. O ganho em 1p36.33 (*C1orf86*, *SKI* e *MORNI*) foi detectado nos casos LFL-15 e MT-8. Estes pacientes não apresentaram neoplasias em comum nos probandos e seus familiares. O gene *SKI* codifica um protooncogene nuclear e funciona como um repressor da via de sinalização TGF-beta podendo atuar no desenvolvimento do tubo neural e diferenciação muscular. Este gene tem sido descrito como alterado em leucemia mieloide aguda e sendo regulado pelo miRNA29a (TEICHLER et al. 2011)

Alterações no gene *ERBB4* (mapeado em 2q34) foram detectados em três casos: a perda foi comum aos casos LFL-1 e MT-2. Em adição, o gene *ERBB4* estava envolvido em ganhos no caso MT-6. Interessantemente, em todas as famílias destes probandos haviam parentes afetados por câncer de cabeça e pescoço. O produto do gene *ERBB4* pertence à família das proteínas quinases e da subfamília dos receptores dos fatores de crescimento epidérmicos. Este gene tem sido relatado como alterado em uma variedade de tumores humanos, incluindo carcinoma cervical invasivo, sarcoma de Ewing e melanoma (HYNES et al. 2009; ZHANG et al. 2010). Mutações neste gene foram relatadas em um limitado número de melanomas cutâneos (MANCA et al. 2013).

A perda em 5p12 foi detectada nos casos MT-1, MT-4 e LFL-3, porém, não há genes conhecidos nesta região. Os carcinomas de mama e melanoma foram os tumores mais frequentemente detectados: LFL-3 e MT-4 apresentaram tumor de mama e há história deste tipo tumoral em membros da família, um parente do MT-1

e o paciente MT-4 tiveram melanoma. Novos estudos são necessários para esclarecer o significado desta alteração e sua associação com risco de desenvolvimento de câncer de mama e melanoma.

Três casos (LFL-13, LFL-15 e MT-3) apresentaram ganhos em 5q31.3 com o envolvimento de 40 genes (*PCDHB2*, *PCDHB3*, *PCDHB4*, *PCDHB5*, *PCDHB6*, *PCDHB17*, *PCDHB7*, *PCDHB8*, *PCDHB16*, *PCDHB9*, *PCDHB10*, *PCDHB11*, *PCDHB12*, *PCDHB13*, *PCDHB14*, *PCDHB18*, *PCDHB19P*, *PCDHB15*, *SLC25A2*, *TAF7*, *PCDHGA1*, *PCDHGA2*, *PCDHGA3*, *PCDHGB1*, *PCDHGA4*, *PCDHGB2*, *PCDHGA5*, *PCDHGB3*, *PCDHGA6*, *PCDHGA7*, *PCDHGB4*, *PCDHGA8*, *PCDHGB5*, *PCDHGA9*, *PCDHGB6*, *PCDHGA10*, *PCDHGB7*, *PCDHGA11*, *PCDHGB8P* e *PCDHGA12*), os quais foram descritos em detalhes acima. O carcinoma colorretal foi diagnosticado nestes pacientes ou membros de suas famílias (LFL-13, LFL-15, MT-3) assim como o melanoma (MT-3, LFL-15).

Foi detectado ganho em 13q12.11 (*GJB6*, *CRYL1* e *MIR4499*) no caso LFL-13 e perda no caso MT-8. O gene *GJB6* codifica uma conexina e mutações neste gene foram associadas com algumas formas de surdez (SCHUTZ et al. 2010; DEL CASTILLO et al. 2005; PALLARES-RUIZ et al. 2002). Algumas famílias apresentaram displasia ectodérmica hidrótica, conhecida como Síndrome de Clouston (ESSENFELDER et al. 2004; LAMARTINE et al. 2000; MOUSUMI, 2013). Outros estudos relataram a associação da expressão de *GJB6* com câncer gástrico e progressão de melanoma (SENTANI et al. 2010; HAASS 2010). Foi também relatada a hipermetilação do gene *GJB6* em 96% de carcinomas colorretais investigados por SIRNES et al. (2011). Entretanto, os autores relataram que a hipermetilação não estava associado à alteração na expressão do gene. A expressão

reduzida do gene *CRYLI* foi associada ao carcinoma hepatocelular (CHEN et al. 2003; CHENG 2010). As duas famílias tinham membros com câncer renal (LFL-13 e MT-8). O *miR4499* possui 288 gene alvos previstos pelo miRDB, incluindo o gene *RAB22A* membro da família de oncogenes *RAS* (WANG e EL NAQA 2008).

Ganhos em 13q12.11 e envolvendo o pseudogene *BASP1P1* foi detectado nos casos LFL-13 e MT-3. Na história familiar de ambos os pacientes foi relatado o carcinoma colorretal.

Um ganho em 16q24.2 (onde se mapeiam os genes *ZC3H18* e *IL17C*) foi encontrado nos casos LFL-2, LFL-13, MT-1 e MT-4. O caso MT-1 apresenta melanoma na família, em comum com o probando do caso MT-4, os pacientes LFL-13 e LFL-2 apresentam tumor renal, já o câncer colorretal foi o de maior prevalência nesses casos, aparecendo na família do caso LFL-2, no probando do caso LFL-13, na família e probando do caso MT-1. Vários estudos demonstraram que o sistema imune desempenha um papel importantíssimo na iniciação e progressão do câncer colorretal. O gene *IL17C*, pertencente ao grupo das citocinas, foi descrito estando relacionado com essa neoplasia (WU et al. 2013). Assim, é possível que o *IL17C* tenha um papel relevante no risco de desenvolvimento de câncer colorretal e outros tumores nestes pacientes e suas famílias.

O ganho em 18q22.3 (onde se mapeiam os genes *ZNF407*, *ZADH2* e *TSHZ1*) foi detectado nos casos LFL-13 e MT-3. O câncer colorretal foi diagnosticado no paciente LFL-13 e em membro da família do probando MT-3. O gene *ZNF407* foi descrito como envolvido com o autismo (REN et al.; 2013). Já o gene *TSHZ1* está relacionado com atresia aural congênita, refere-se a um aspecto de deformidades da orelha presentes ao nascimento que envolve algum grau de insuficiência no

desenvolvimento do canal auditivo (FEENSTRA et al. 2011). Assim, aparentemente, estes genes estariam associados a outras características e não teriam função no processo tumoral.

Os casos LFL-14, LFL-15 e MT-1 apresentaram ganhos em 20q13.33, envolvendo 11 genes (*MIR124-3*, *YTHDF1*, *BIRC7*, *MIR3196*, *NKAIN4*, *FLJ16779*, *ARFGAP1*, *MIR4326*, *COL20A1*, *CHRNA4* e *KCNQ2*), os quais foram discutidos anteriormente. O paciente MT-1 e parente do paciente LFL-15 tiveram história de melanoma, o caso MT-1 apresentou câncer colorretal em comum com membros da família do caso LFL-15. Alguns destes genes foram discutidos acima na comparação entre os casos LFL.

Ganho em 22q13.33 envolvendo o gene *ZBED4* foi detectado nos casos LFL-12 e MT-2. Os dois pacientes apresentaram o câncer de mama assim como membros da família do caso MT-2. Este gene foi relacionado com transtorno afetivo bipolar e esquizofrenia (SEVERINSEN et al. 2006; NYEGAARD et al. 2010). Para o nosso conhecimento estes pacientes não tem história de transtorno bipolar e ou esquizofrenia.

Os casos LFL-10, LFL-12, MT-14 e MT-15 apresentaram ganhos em Xq27.1, onde não há descrição de genes conhecidos. O câncer colorretal se apresentou comum no paciente MT-14 e na família do caso MT-15, já o câncer de mama foi comum nos pacientes LFL-10 e LFL-12 e o câncer de endométrio foi comum nos pacientes LFL-10 e MT-15.

O ganho em Xq21.2 (não há genes conhecidos) foi detectado nos casos LFL-12 e MT-6. O câncer de mama foi comum nos dois pacientes.

Quando realizamos a comparação entre os dois grupos, sem excluir o caso LFL-8, as grandes deleções encontradas no cromossomo 7 e as cnLOH, observamos um total de 2158 genes em comuns. Utilizando a ferramenta *Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA) (<http://www.broadinstitute.org/gsea/index.jsp>), verificou-se que destes, 154 são fatores de transcrição. Desta forma, um número considerável de genes associados com câncer apresentou-se alterado e, em conjunto podem potencialmente contribuir para o desenvolvimento de múltiplas neoplasias nesses pacientes e seus familiares.

As comparações incluindo todos os casos do estudo e todos os tipos de alterações (incluindo perdas, ganhos e cnLOH) revelou achados interessantes. Foram detectados 11 genes em comuns em nove casos: MT-14 (cnLOH), LFL-8 (perda), LFL-14 (cnLOH), MT-6 (cnLOH), LFL-7 (cnLOH), LFL-2 (cnLOH), LFL-12 (cnLOH), LFL-3 (cnLOH) e LFL-6 (cnLOH). Cinco destes casos (LFL-3, LFL-6, LFL-8, LFL-12 e LFL-14) apresentaram câncer de tireoide. Os genes encontrados em comuns nesses pacientes foram: *ARHGEF9*, *ASB12*, *FAM123B*, *FRMD8P1*, *LAS1L*, *LOC92249*, *MSN*, *MTMR8*, *SPIN4*, *ZC3H12B*, *ZC4H2*. Ao utilizarmos a ferramenta GSEA para enriquecimento destes genes pudemos verificar que o gene *FAM123B* é pertencente ao grupo dos supressores tumorais. O gene *FAM123B/AMER1* está relacionado com osteopatia estriada associada a esclerose craniana e também foi relatado como envolvido no tumor de Wilms (ZICARI et al. 2012; XU et al. 2013) Este gene é um possível alvo de investigação para o melhor entendimento do fenótipo apresentado por esses pacientes. Aury-Landas et al. (2013) identificaram quatro casos com alterações que envolviam genes associados com a remodelação da

cromatina e também apresentavam neoplasias em comuns, como tumor do sistema nervoso central.

A maioria das síndromes de cânceres familiares hereditárias envolve um ou dois tipos específicos de tumores enquanto a síndrome de Li-Fraumeni é caracterizada pelo desenvolvimento de uma variedade de doenças malignas, com alta taxa de incidência de tumores de cérebro, mama e leucemia mielóide aguda (HWANG et al. 2003; GONZALEZ et al., 2009). Estes tipos tumorais estavam presentes também na casuística deste estudo. Após o enriquecimento das alterações genéticas detectadas no grupo de pacientes Li-Fraumeni-*Like*, foi observada uma associação estatisticamente significativa de 224, 16 e 61 genes, com os tumores de cérebro, mama e leucemia mielóide aguda, respectivamente. O câncer de pulmão, colorretal, estômago, próstata, ovário, pâncreas, linfoma, melanoma e carcinoma do plexo coróide também são descritos em pacientes com LFL/LFS. As alterações também foram estatisticamente associadas com câncer de próstata e pulmão (brônqu coastal e bronquíolo-alveolar), concordando com perfil dos tumores detectados nestes pacientes. Assim, os pacientes LFL com ausência de mutações no gene *TP53* apresentaram múltiplas alterações envolvendo genes que foram associados com o espectro de tumores característicos da LFL sugerindo que não apenas um mas vários genes alterados em conjunto poderiam estar associados com a predisposição ao desenvolvimento de tumores nestes pacientes.

No grupo de pacientes LFL também foram identificados 1201 genes relacionados com carcinoma gástrico. Este tipo tumoral foi relatado nos familiares de quatro pacientes (LFL-1, LFL-2, LFL-8 e LFL-15). MASCIARI et al. (2011) relataram que 4,9% (21/429) de indivíduos Li-Fraumeni apresentam câncer gástrico.

Entre os pacientes com múltiplos tumores primários, foi observado 1275 genes enriquecidos para câncer de mama, destes 485 genes também estavam relacionados com processos envolvendo o carcinoma de ovário. O carcinoma de mama foi observado em cinco probandos (MT-2, MT-3, MT-4, MT-6 e MT-8) assim como em membros de cinco famílias (MT-2, MT-3, MT-4, MT-7 e MT-8). Semelhante ao descrito acima, é possível que estes pacientes tenham predisposição hereditária ao desenvolvimento de tumores por apresentarem alterações genômicas envolvendo vários genes descritos em câncer.

A função dos nove genes encontrados em comum nos casos que desenvolveram câncer de tireoide foi pesquisada no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>). O gene *ARHGEF9* codifica uma proteína que regula o *CDC42*, cuja ativação foi associada com a migração e invasão celular em câncer colorretal (GAO et al 2013). O gene *ASB12* codifica uma proteína que funciona como supressor de proteínas sinalizadoras de citocinas. O supressor tumoral *FAM123B/AMER1* foi associado com o tumor de Wilms (XU et al. 2013). Este tipo de neoplasia é um dos tumores encontrados no espectro da LFS/ LFL

O gene *FRMD8P1* é um pseudogene; *LOC92249*, pertence ao grupo de RNA não codificadores (ncRNA); *ZC3H12B*, pertencente à família *zinc finger* e o gene *MTMR8* não foi associado com tumores, até o momento. O gene *LASIL* codifica uma proteína nucleolar importante para a proliferação celular e biogênese do ribossomo, cuja depleção ativa a via do *TP53* e ocasiona a parada do ciclo celular na fase G1 (CASTLE et al. 2010). Vale ressaltar que a desregulação de genes associados com a biogênese do ribossomo já foram associados com o desenvolvimento de câncer, tanto

em humanos como em animais (AMSTERDAM et al. 2004; BELIN et al. 2009). Estudos recentes utilizando análise de expressão proteica por imunohistoquímica associaram o aumento de expressão da proteína MSN com a transição epitélio-mesênquima em tumores de mama, assim como com a progressão de tumores cerebrais (gliomas e astrocitomas) e pior sobrevida global (WANG et al. 2012; WU et al. 2013 e ZHU et al. 2013). O gene *SPIN4* foi associado com o câncer de ovário, enquanto o gene *ZC4H2* foi associado com o carcinoma hepatocelular e deficiência intelectual (PENG et al. 2008; YU et al. 2002; HIROMI et al. 2013).

Em conjunto, os dados obtidos neste estudo indicam que estes pacientes são portadores de várias alterações estruturais que podem contribuir para o fenótipo associado com o desenvolvimento de múltiplos tumores. Novos estudos são necessários para confirmar as alterações detectadas nos pacientes e em seus familiares.

7 CONCLUSÕES

- A plataforma de microarranjos de alta resolução (*CytoScan HD Array*) utilizada na análise molecular permitiu identificar um grande número de alterações genômicas raras (146 no grupo LFL e 67 no grupo MT) e novas raras (76 no grupo LFL e 15 no grupo MT), entre ganhos, perdas e cnLOHs nos dois grupos de pacientes estudados.
- O caso LFL-8, em particular, apresentou um grande número de alterações raras e novas raras (109). Apesar da paciente não apresentar quadro fenotípico característico da Síndrome de Turner, a análise molecular identificou o mosaicismo 45,X/46,XX confirmado por análise cromossômica por bandamento.
- Dois casos apresentaram alterações envolvendo 7q, sendo uma deleção em mosaicismo de 42 Mb (MT-2) e uma cnLOH de 49 Mb (MT-4). Essa região é potencial candidata para estar associada com o fenótipo de múltiplos tumores detectados nestes pacientes.
- As alterações classificadas como cnLOHs foram observadas em quase todos os casos, sendo mais frequentes nos casos LFL-11, LFL-14, MT-8 e MT-14. As regiões/genes envolvidos em cnLOHs podem estar associados a inativação de genes supressores tumorais ou ativação de oncogenes tendo, portanto, um papel na carcinogênese.
- A investigação de mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* em famílias específicas (MT-2 e MT-4) não revelou a presença de mutações patogênicas,

embora tenham sido identificadas algumas variantes de significado desconhecido.

- Considerando todas as alterações novas raras e raras, a comparação dos casos LFL e MT revelou 11 genes alterados (*ARHGEF9*, *ASB12*, *FAM123B*, *FRMD8P1*, *LASIL*, *LOC92249*, *MSN*, *MTMR8*, *SPIN4*, *ZC3H12B*, *ZC4H2*) comuns a nove casos. Notavelmente, cinco desses pacientes (LFL-3, LFL-6, LFL-8, LFL-12 e LFL-14) desenvolveram câncer de tireóide, sugerindo o envolvimento desses genes na etiologia deste tipo tumoral.
- Os dados obtidos neste estudo indicam que estes pacientes podem ser portadores de várias alterações estruturais, muitas delas envolvendo genes associados com processos tumorais, que podem contribuir para o fenótipo associado com o desenvolvimento de múltiplos tumores.
- Novos estudos são necessários, principalmente envolvendo as cnLOH para confirmar as alterações encontradas e o seu significado na predisposição hereditária ao câncer.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Achatz MI, Olivier M, Le Calvez F, et al. The TP53 mutation, R337H, is associated with Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-like syndromes in Brazilian families. **Cancer Lett** 2007; 245:96-102.

Achatz MI. **Modificadores de penetrância de mutações germinativas no gene TP53 em famílias brasileiras com diagnóstico clínico da Síndrome de Li-Fraumeni e Li-Fraumeni-like: impacto dos polimorfismos intragênicos do TP53 e de genes que regulam a atividade da p53**. São Paulo; 2008. [Tese de Doutorado-Faculdade de Medicina; Universidade de São Paulo]

Almeida MQ, Stratakis CA. Carney complex and other conditions associated with micronodular adrenal hyperplasias. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab** 2010; 24:907-14.

Amsterdam A, Sadler KC, Lai K, et al. Many ribosomal protein genes are cancer genes in zebrafish. **PLoS Biol** 2004; 2:E139.

Antoni G, Morange PE, Luo Y, et al. Multi-stage multi-design strategy provides strong evidence that the BAI3 locus is associated with early-onset venous thromboembolism. **J Thromb Haemost** 2010; 20:946-48.

Antoniou A, Pharoah PD, Narod S, et al. Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. **Am J Hum Genet** 2003; 72:1117-30.

Apostolou P, Fostira F. Hereditary breast cancer: the era of new susceptibility genes. **Biomed Res Int** 2013; 2013:747318.

Aury-Landas J, Bougeard G, Castel H, et al. Germline copy number variation of genes involved in chromatin remodelling in families suggestive of Li-Fraumeni syndrome with brain tumours. **Eur J Hum Genet** 2013; 21:1369-76.

Baatout S, Jacquet P, Michaux A, et al. Developmental abnormalities induced by X-irradiation in p53 deficient mice. **In Vivo** 2002; 16:215-21.

Bachinski LL, Olufemi SE, Zhou X, et al. Genetic mapping of a third Li-Fraumeni syndrome predisposition locus to human chromosome 1q23. **Cancer Res** 2005; 65:427-31.

Bailey A, Hervas A, Matthews N, et al. A full genome screen for autism with evidence for linkage to a region on chromosome 7q. **Hum Mol Genet** 1998; 7:571-78.

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

Beekman R, Valkhof MG, Sanders MA, et al. Sequential gain of mutations in severe congenital neutropenia progressing to acute myeloid leukemia. **Blood** 2012; 119:5071-7.

Belin S, Beghin A, Solano-González E, et al. Dysregulation of ribosome biogenesis and translational capacity is associated with tumor progression of human breast cancer cells. **PLoS One** 2009; 4:e7147.

Bell DW, Varley JM, Szydlo TE, et al. Heterozygous germ line hCHK2 mutations in Li-Fraumeni syndrome. **Science** 1999; 286:2528-31.

Bignell GR, Huang J, Greshock J, et al. High-resolution analysis of DNA copy number using oligonucleotide microarrays. **Genome Res** 2004; 14:287-95.

Birch JM, Hartley AL, Tricker KJ, et al. Prevalence and diversity of constitutional mutations in the p53 gene among 21 Li-Fraumeni families. **Cancer Res** 1994; 54:1298-304.

Birch JM, Alston RD, McNally RJ, et al. Relative frequency and morphology of cancers in carriers of germline TP53 mutations. **Oncogene** 2001; 20:4621-8.

Frebourg T, Malkin D, Friend S. Cancer risks from germ line tumor suppressor gene mutations. **Princess Takamatsu Symp** 1991; 22:61-70.

Bourdon JC. p53 Family isoforms. **Curr Pharm Biotechnol** 2007; 8:332-6.

Bougeard G, Sesboué R, Baert-Desurmont S, et al, Molecular basis of the Li-Fraumeni syndrome: an update from the French LFS families. **J Med Genet** 2008; 45:535-8.

Bray F, Jemal A, Grey N, Ferlay J, Forman D. Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008-2030): a population-based study. **Lancet Oncol** 2012; 13:790-801.

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

Bullinger L, Krönke J, Schön C, et al. Identification of acquired copy number alterations and uniparental disomies in cytogenetically normal acute myeloid leukemia using high-resolution single-nucleotide polymorphism analysis. **Leukemia** 2010; 24:438-49.

Caixeiro NJ, Martin JL, Scott CD. Silencing the mannose 6-phosphate/IGF-II receptor differentially affects tumorigenic properties of normal breast epithelial cells. **Int J Cancer** 2013; 133:2542-50.

Cannavan MC. **Diagnóstico molecular de mutações germinativas no gene TP53 em pacientes com múltiplos tumores primários ou com tumores isolados típicos da síndrome de Li-Fraumeni** São Paulo; 2011. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antonio Prudente].

Castle CD, Cassimere EK, Lee J, Denicourt C. Las1L is a nucleolar protein required for cell proliferation and ribosome biogenesis. **Mol Cell Biol** 2010; 30:4404-14.

Cao X, Liu D, Yan X, et al. Stat3 inhibits WTX expression through up-regulation of microRNA-370 in Wilms tumor. **FEBS Lett** 2013; 587:639-44.

Chan JK, Blansit K, Kiet T, et al. The inhibition of miR-21 promotes apoptosis and chemosensitivity in ovarian cancer. **Gynecol Oncol** 2014 Jan 25. [Epub ahead of print]

Chen J, Yu L, Li D, et al. Human CRYL1, a novel enzyme-crystallin overexpressed in liver and kidney and downregulated in 58% of liver cancer tissues from 60 Chinese patients, and four new homologs from other mammals. **Gene** 2003; 302:103-13.

Cheng IK, Ching AK, Chan TC, et al. Reduced CRYL1 expression in hepatocellular carcinoma confers cell growth advantages and correlates with adverse patient prognosis. **J Pathol** 2010; 220:348-60.

Chompret A, Abel A, Stoppa-Lyonnet D, et al. Sensitivity and predictive value of criteria for p53 germline mutation screening. **J Med Genet** 2001; 38:43-7.

Cirulli ET, Goldstein DB. Uncovering the roles of rare variants in common disease through whole-genome sequencing. **Nat Rev Genet** 2010; 11:415-25.

Cuddihy AR, Bristow RG. The p53 protein family and radiation sensitivity: yes or no? **Cancer Metastasis Rev** 2004; 23:237-57.

Cybulski C, Wokołarczyk D, Jakubowska A, et al. Risk of breast cancer in women with a CHEK2 mutation with and without a family history of breast cancer. **J Clin Oncol** 2011; 29:3747-52.

Dallosso AR, Hancock AL, Szemes M, et al. Frequent long-range epigenetic silencing of protocadherin gene clusters on chromosome 5q31 in Wilms' tumor. **PLoS Genet** 2009; 5:e1000745.

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

[DGV] Database of Genomic Variants. Available from:
<[URL:http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home](http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home)> [2013 nov 20]

Dehan E, Ben-Dor A, Liao W, et al. Chromosomal aberrations and gene expression profiles in non-small cell lung cancer. **Lung Cancer** 2007; 56:175-84.

del Castillo FJ, Rodríguez-Ballesteros M, Alvarez A, et al. A novel deletion involving the connexin-30 gene, del(GJB6-d13s1854), found in trans with mutations in the GJB2 gene (connexin-26) in subjects with DFNB1 non-syndromic hearing impairment. **J Med Genet** 2005; 42:588-94.

Delvecchio M, Gaucher J, Aguilar-Gurrieri C, Ortega E, Panne D. Structure of the p300 catalytic core and implications for chromatin targeting and HAT regulation. **Nat Struct Mol Biol** 2013; 20:1040-6.

Diller L, Sexsmith E, Gottlieb A, Li FP, Malkin D. Germline p53 mutations are frequently detected in young children with rhabdomyosarcoma. **J Clin Invest** 1995; 95:1606-11.

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

Eeles RA. Germline mutations in the TP53 gene. **Cancer Surv** 1995; 25:101-24.

Elsheikh M, Dunger DB, Conway GS, Wass JAH. Turner's Syndrome in adult hood. **Endocrine Rev** 2002; 23:120-40.

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

Essenfelder GM, Bruzzone R, Lamartine J, et al. Connexin30 mutations responsible for hidrotic ectodermal dysplasia cause abnormal hemichannel activity. **Hum Mol Genet** 2004; 13:1703-14.

Evans DG, Birch JM, Ramsden RT, Sharif S, Baser ME. Malignant transformation and new primary tumours after therapeutic radiation for benign disease: substantial risks in certain tumour prone syndromes. **J Med Genet** 2006; 43:289-94.

Feenstra I, Vissers LE, Pennings RJ, et al. Disruption of teashirt zinc finger homeobox 1 is associated with congenital aural atresia in humans. **Am J Hum Genet** 2011; 89:813-9.

Felix CA, Slavic I, Dunn M, et al. p53 gene mutations in pediatric brain tumors. **Med Pediatr Oncol** 1995; 25:431-6.

Finkova A, Vazna A, Hrachovina O, Bendova S, Prochazkova K, Sedlacek Z. The TP53 gene promoter is not methylated in families suggestive of Li-Fraumeni syndrome with no germline TP53 mutations. **Cancer Genet Cytogenet** 2009; 193:63-6.

Frebourg T, Abel A, Bonaiti-Pellie C, et al. Li-Fraumeni syndrome: update, new data and guidelines for clinical management]. **Bull Cancer** 2001; 88:581-7.

Garber JE, Burke EM, Lavally BL, et al. Choroid plexus tumors in the breast cancer-sarcoma syndrome. **Cancer** 1990; 66:2658-60.

[GSEA] Gene set enrichment analysis. Available from:

<URL:<http://www.broadinstitute.org/gsea/login.jsp?jsessionid=4AAF0BF55631947C6F4398A0AA3BA132>> [2014 jan 15]

Gegonne A, Devaiah BN, Singer DS. TAF7: traffic controller in transcription initiation. **Transcription** 2013; 4:29-33.

Giacomazzi J. **Prevalência da mutação germinativa tp53 p.r337h em indivíduos com tumores do espectro da síndrome de Li-Fraumeni**. Porto Alegre; 2012. [Tese de Doutorado-Ciências Médicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul].

Giacomazzi J, Selistre SG, Rossi C, et al. Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-like syndrome among children diagnosed with pediatric cancer in Southern Brazil. **Cancer** 2013; 119:4341-9.

Gómez-Gómez Y, Organista-Nava J, Gariglio P. Deregulation of the miRNAs Expression in Cervical Cancer: Human Papillomavirus Implications. **Biomed Res Int** 2013; 2013:407052.

Gonzalez KD, Noltner KA, Buzin CH, et al. Beyond Li Fraumeni Syndrome: clinical characteristics of families with p53 germline mutations. **J Clin Oncol** 2009; 27:1250-6.

Grand FH, Hidalgo-Curtis CE, Ernst T, et al. Frequent CBL mutations associated with 11q acquired uniparental disomy in myeloproliferative neoplasms. **Blood** 2009; 113:6182-92.

Graziano F, Humar B, Guilford P. The role of the E-cadherin gene (CDH1) in diffuse gastric cancer susceptibility: from the laboratory to clinical practice. **Ann Oncol** 2003; 14:1705-13.

Grinfeld J, Gerrard G, Alikian M, et al. A common novel splice variant of SLC22A1(OCT1) is associated with impaired responses to imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia. **Br J Haematol** 2013; 163:631-9.

Haass NK, Ripperger D, Wladykowski E, et al. Melanoma progression exhibits a significant impact on connexin expression patterns in the epidermal tumor microenvironment. **Histochem Cell Biol** 2010; 133:113-24.

Hafsi H, Hainaut P. Redox control and interplay between p53 isoforms: roles in the regulation of basal p53 levels, cell fate, and senescence. **Antioxid Redox Signal** 2011; 15:1655-67.

Harbron RW, Feltbower RG, Glaser A, Lilley J, Pearce MS. Secondary malignant neoplasms following radiotherapy for primary cancer in children and young adults. **Pediatr Hematol Oncol** 2013. [Epub ahead of print]

Hartley AL, Birch JM, Kelsey AM, Marsden HB, Harris M, Teare MD. Are germ cell tumors part of the Li-Fraumeni cancer family syndrome? **Cancer Genet Cytogenet** 1989; 42:221-6.

Hartley AL, Birch JM, Tricker K, et al. Wilms' tumor in the Li-Fraumeni cancer family syndrome. **Cancer Genet Cytogenet** 1993; 67:133-5.

Hearle N, Schumacher V, Menko FH, et al. Frequency and spectrum of cancers in the Peutz-Jeghers syndrome. **Clin Cancer Res** 2006; 12:3209-15.

Herman SB, Holman SK, Robertson SP, Davidson L, Taragin B, Samanich J. Severe osteopathia striata with cranial sclerosis in a female case with whole WTX gene deletion. **Am J Med Genet A** 2013; 161:594-99.

Heymann S, Delalogue S, Rahal A, et al. Radio-induced malignancies after breast cancer postoperative radiotherapy in patients with Li-Fraumeni syndrome. **Radiat Oncol** 2010, 5:104.

Hirata H, Nanda I, van Riesen A, et al. ZC4H2 Mutations are associated with arthrogyrosis multiplex congenita and intellectual disability through impairment of central and peripheral synaptic plasticity. **Am J Hum Genet** 2013; 92:681-95.

Hisada M, Garber JE, Fung CY, Fraumeni JF Jr, Li FP. Multiple primary cancers in families with Li-Fraumeni syndrome. **J Natl Cancer Inst** 1998; 90:606-11.

Hollstein M, Hainaut P. Massively regulated genes: the example of TP53. **J Pathol** 2010; 220:164-73.

Hook EB, Warburton D. Turner syndrome revisited: review of new data supports the hypothesis that all viable 45,X cases are cryptic mosaics with a rescue cell line, implying an origin by mitotic loss. **Hum Genet** 2014 Jan 30. [Epub ahead of print]

Huh JW, Kim HC, Kim SH, et al. Prognostic impact of p300 expression in patients with colorectal cancer. **J Surg Oncol** 2013; 108:374-7.

Hwang SJ, Lozano G, Amos CI, Strong LC. Germline p53 mutations in a cohort with childhood sarcoma: sex differences in cancer risk. **Am J Hum Genet** 2003; 72:975-83.

Hynes NE, MacDonald G. ErbB receptors and signaling pathways in cancer. **Curr Opin Cell Biol** 2009; 21:177-84.

Idbaih A, Boisselier B, Sanson M. Tumor genomic profiling and TP53 germline mutation analysis of first-degree relative familial gliomas. **Cancer Genet Cytogenet** 2007; 176:121-26.

Im E, Jung J, Rhee SH. Toll-like receptor 5 engagement induces interleukin-17C expression in intestinal epithelial cells. **J Interferon Cytokine Res** 2012; 32:583-91.

Izawa N, Matsumoto S, Manabe J, et al. A Japanese patient with Li-Fraumeni syndrome who had nine primary malignancies associated with a germline mutation of the p53 tumor-suppressor gene. **Int J Clin Oncol** 2008; 13:78-82.

Jacobs P, Dalton P, James R, et al. Turner syndrome: a cytogenetic and molecular study. **Ann Hum Genet** 1997; 61:471-83.

Johnson RF, Perkins ND. Nuclear factor- κ B, p53, and mitochondria: regulation of cellular metabolism and the Warburg effect. **Trends Biochem Sci** 2012; 37:317-24.

Kamens HM, Corley RP, McQueen MB, et al. Nominal association with CHRNA4 variants and nicotine dependence. **Genes Brain Behav** 2013; 12:297-304.

Kan Z, Jaiswal BS, Stinson J, et al. Diverse somatic mutation patterns and pathway alterations in human cancers. **Nature** 2010; 466:869-73.

Kaminsky EB, Kaul V, Paschall J, et al. An evidence-based approach to establish the functional and clinical significance of copy number variants in intellectual and developmental disabilities. **Genet Med** 2011; 13:777-84.

Kangelaris KN, Gruber SB. Clinical implications of founder and recurrent CDH1 mutations in hereditary diffuse gastric cancer. **JAMA** 2007; 297:2410-1.

Kast K, Krause M, Schuler M, et al. Late onset Li-Fraumeni Syndrome with bilateral breast cancer and other malignancies: case report and review of the literature. **BMC Cancer** 2012; 12:217.

Kato F, Ootsuyama A, Nomoto S, Kondo S, Norimura T. Threshold effect for teratogenic risk of radiation depends on dose-rate and p53-dependent apoptosis. **Int J Radiat Biol** 2001; 77:13-9.

Kemp CJ, Wheldon T, Balmain A. p53-deficient mice are extremely susceptible to radiation-induced tumorigenesis. **Nat Genet** 1994; 8:66-9.

Kim IJ, Kang HC, Shin Y, et al. A TP53-truncating germline mutation (E287X) in a family with characteristics of both hereditary diffuse gastric cancer and Li-Fraumeni syndrome. **J Hum Genet** 2004; 49:591-5.

Kim MS, Lee SH, Yoo NJ, Lee SH. Frameshift mutations of tumor suppressor gene EP300 in gastric and colorectal cancers with high microsatellite instability. **Hum Pathol** 2013; 44:2064-70.

Kleinerman RA. Radiation-sensitive genetically susceptible pediatric sub-populations. **Pediatr Radiol** 2009; 39 Suppl 1:S27-31.

Knappskog S, Lonning PE. Effects of the MDM2 promoter SNP285 and SNP309 on Sp1 transcription factor binding and cancer risk. **Transcription** 2011; 2:207-10.

Knappskog S, Trovik J, Marcickiewicz J, et al. SNP285C modulates oestrogen receptor/Sp1 binding to the MDM2 promoter and reduces the risk of endometrial but not prostatic cancer. **Eur J Cancer** 2012; 48:1988-96.

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

Krutilkova V, Trkova M, Fleitz J, et al. Identification of five new families strengthens the link between childhood choroid plexus carcinoma and germline TP53 mutations. **Eur J Cancer** 2005; 41:1597-603.

Kryh H, Carén H, Erichsen J, et al. Comprehensive SNP array study of frequently used neuroblastoma cell lines; copy neutral loss of heterozygosity is common in the cell lines but uncommon in primary tumors. **BMC Genomics** 2011; 12:443.

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

Laity JH, Lee BM, Wright PE. Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity. **Curr Opin Struct Biol** 2001; 11:39-46.

Lamartine J, Munhoz Essenfelder G, Kibar Z, et al. Mutations in GJB6 cause hidrotic ectodermal dysplasia. **Nat Genet** 2000; 26:142-4.

Lang JC, Schuller DE. Differential expression of a novel serine protease homologue in squamous cell carcinoma of the head and neck. **Br J Cancer** 2001; 84:237-43.

Laporte J, Blondeau F, Buj-Bello A, Mandel JL. The myotubularin family: from genetic disease to phosphoinositide metabolism. **Trends Genet** 2001; 17:221-28.

Lapunzina P, Monk D. The consequences of uniparental disomy and copy number neutral loss-of-heterozygosity during human development and cancer. **Biol Cell** 2011; 103:303-17.

Lee LS, Szafranska-Schwarzbach AE, Wylie D, et al. Investigating MicroRNA expression profiles in pancreatic cystic neoplasms. **Clin Transl Gastroenterol** 2014; 5:e47.

Li F, Yin X, Luo X, Li HY, Su X, Wang XY, Chen L, Zheng K, Ren GS. Livin promotes progression of breast cancer through induction of epithelial-mesenchymal transition and activation of AKT signaling. **Cell Signal** 2013; 25:1413-22.

Li FP, Fraumeni JF Jr. Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms. A familial syndrome? **Ann Intern Med** 1969; 71:747-52.

Li FP, Fraumeni JF Jr. Rhabdomyosarcoma in children: epidemiologic study and identification of a familial cancer syndrome. **J Natl Cancer Inst** 1969; 43:1365-73.

Li FP, Fraumeni JF Jr, Mulvihill JJ, et al. A cancer family syndrome in twenty-four kindreds. **Cancer Res** 1988; 48:5358-62.

Li X, Fan S, Li L, et al. RNA interference-mediated knockdown of Livin suppresses cell proliferation and invasion and enhances the chemosensitivity to cisplatin in human osteosarcoma cells. **Int J Oncol** 2013; 43:159-68.

Li W, Song X, Zhang H, et al. Association study of RELN polymorphisms with schizophrenia in Han Chinese population. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry** 2011; 35:1505-11.

Li YJ, Sanson M, Hoang-Xuan K, et al. Incidence of germ-line p53 mutations in patients with gliomas. **Int J Cancer** 1995; 64:383-7.

Lindor NM, Rabe K, Petersen GM, et al. Lower cancer incidence in Amsterdam-I criteria families without mismatch repair deficiency: familial colorectal cancer type X. **JAMA** 2005; 293:1979-85.

Lindor NM, McMaster ML, Lindor CJ, Greene MH; National Cancer Institute, Division of Cancer Prevention, Community Oncology and Prevention Trials Research Group. Concise handbook of familial cancer susceptibility syndromes – second edition. **J Natl Cancer Inst Monogr** 2008; 1-93.

Lips EH, van Eijk R, de Graaf EJ, et al. Progression and tumor heterogeneity analysis in early rectal cancer. **Clin Cancer Res** 2008; 14:772-81.

Lynch PM. Surveillance and treatment of hereditary non-polyposis colorectal cancer. **Anticancer Res** 1994; 14:1641-6.

Lynch HT, de la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. **N Engl J Med** 2003; 348:919-32.

Mai PL, Malkin D, Garber JE, et al. Li-Fraumeni syndrome: report of a clinical research workshop and creation of a research consortium. **Cancer Genet** 2012; 205:479-87.

Malkin D, Li FP, Strong LC, et al. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. **Science** 1990; 250:1233-8.

Malkin D. Li-fraumeni syndrome. **Genes Cancer** 2011; 2:475-84.

Manca A, Lissia A, Cossu A, et al. Mutations in ERBB4 may have a minor role in melanoma pathogenesis. **J Invest Dermatol** 2013; 133:1685-7.

Masciari S, Dewanwala A, Stoffel EM, et al. Gastric cancer in individuals with Li-Fraumeni syndrome. **Genet Med** 2011; 13:651-7.

Mason-Suares H, Kim W, Grimmett L, et al. Density matters: comparison of array platforms for detection of copy-number variation and copy-neutral abnormalities. **Genet Med** 2013; 15:706-12.

May P, May E. Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. **Oncogene** 1999 13; 18:7621-36.

McIntyre JF, Smith-Sorensen B, Friend SH, Kassell J, Borresen AL, Yan YX, Russo C, Sato J, Barbier N, Miser J, et al. Germline mutations of the p53 tumor suppressor gene in children with osteosarcoma. **J Clin Oncol** 1994; 12:925-30.

McNerney ME, Brown CD, Wang X, et al. CUX1 is a haploinsufficient tumor suppressor gene on chromosome 7 frequently inactivated in acute myeloid leukemia. **Blood** 2013; 121:975-83.

Melcher R, Hartmann E, Zopf W, et al. LOH and copy neutral LOH (cnLOH) act as alternative mechanism in sporadic colorectal cancers with chromosomal and microsatellite instability. **Carcinogenesis** 2011; 32:636-42.

Meadows AT, Friedman DL, Neglia JP, et al. Second neoplasms in survivors of childhood cancer: findings from the Childhood Cancer Survivor Study cohort. **J Clin Oncol** 2009; 27:2356-62.

Mester JL, Moore RA, Eng C. PTEN germline mutations in patients initially tested for other hereditary cancer syndromes: would use of risk assessment tools reduce genetic testing? **Oncologist** 2013; 18:1083-90.

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.

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

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

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **INCA e Ministério da Saúde apresentam estimativas de câncer para 2014**. Disponível em: <URL:http://www.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/2013/inca_ministerio_saude_apresentam_estimativas_cancer_2014> [2014 jan 12]

Mishra PJ, Song B, Mishra PJ, et al. MiR-24 tumor suppressor activity is regulated independent of p53 and through a target site polymorphism. **PLoS One** 2009; 4:e8445.

Mitchell G, Ballinger ML, Wong S, et al. High frequency of germline TP53 mutations in a prospective adult-onset sarcoma cohort. **PLoS One** 2013; 8:e69026.

Moorhead PS, Nowell PC, Mellman WJ, Battips DM, Hungerford DA. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. **Exp Cell Res** 1960; 20:613-6.

Mousumi T, Xiong Z, Lu L, Liu S, Xia K, Hu Z. Identification of a known GJB6 mutation in an autosomal dominant inherited Chinese family with hidrotic ectodermal dysplasia. **Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban** 2013; 38:761-5

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

Neglia JP, Robison LL, Stovall M, et al. New primary neoplasms of the central nervous system in survivors of childhood cancer: a report from the Childhood Cancer Survivor Study. **J Natl Cancer Inst** 2006; 98:1528-37.

Nikoloski G, Langemeijer SMC, Kuiper RP, et al. Somatic mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myelodysplastic syndromes. **Nat Genet** 2010; 42:665-67.

Nutting C, Camplejohn RS, Gilchrist R, et al. A patient with 17 primary tumours and a germ line mutation in TP53: tumour induction by adjuvant therapy? **Clin Oncol (R Coll Radiol)** 2000; 12:300-4.

Nyegaard M, Severinsen JE, Als TD, et al. Support of association between BRD1 and both schizophrenia and bipolar affective disorder. **Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet** 2010; 153B:582-91.

O'Keefe C, McDevitt MA, Maciejewski JP. Copy neutral loss of heterozygosity: a novel chromosomal lesion in myeloid malignancies. **Blood** 2010; 115:2731-9.

Oliveira C, Moreira H, Seruca R, de Oliveira MC, Carneiro F. Role of pathology in the identification of hereditary diffuse gastric cancer: report of a Portuguese family. **Virchows Arch** 2005; 446:181-4.

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

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

Pallares-Ruiz N, Blanchet P, Mondain M, Claustres M, Roux AF. A large deletion including most of GJB6 in recessive non syndromic deafness: a digenic effect? **Eur J Hum Genet** 2002; 10:72-6.

Palmero EI, Schüler-Faccini L, Caleffi M, et al. Detection of R337H, a germline TP53 mutation predisposing to multiple cancers, in asymptomatic women participating in a breast cancer screening program in Southern Brazil. **Cancer Lett** 2008; 261:21-5.

Paulasova P, Diblik J, Trkova M, Macek M Sr, Sedlacek Z. Increased sperm aneuploidy in two male carriers of germline TP53 mutations. **Cancer Genet** 2011; 204:278-81.

Persico AM, D'Agruma L, Maiorano N, et al. Reelin gene alleles and haplotypes as a factor predisposing to autistic disorder. **Mol Psychiatry** 2001; 6:150-9.

Persico AM, Bourgeron T. Searching for ways out of the autism maze: genetic, epigenetic and environmental clues. **Trends Neurosci** 2006; 29:349-58.

Petitjean A, Achatz MI, Borresen-Dale AL, Hainaut P, Olivier M. TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. **Oncogene** 2007; 26:2157-65.

Petrović N, Mandušić V, Stanojević B, et al. The difference in miR-21 expression levels between invasive and non-invasive breast cancers emphasizes its role in breast cancer invasion. **Med Oncol** 2014; 31:867.

Pivnick EK, Furman WL, Velagaleti GV, Jenkins JJ, Chase NA, Ribeiro RC. Simultaneous adrenocortical carcinoma and ganglioneuroblastoma in a child with Turner syndrome and germline p53 mutation. **J Med Genet** 1998; 35:328-32.

Prior C, Perez-Gracia JL, Garcia-Donas J, et al. Identification of Tissue microRNAs Predictive of Sunitinib Activity in Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma. **PLoS One** 2014; 9:e86263.

Raychaudhuri S. Mapping rare and common causal alleles for complex human diseases. **Cell** 2011; 147:57-69.

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

Ren CM, Liang Y, Wei F, et al. Balanced translocation t(3;18)(p13;q22.3) and point mutation in the ZNF407 gene detected in patients with both moderate non-syndromic intellectual disability and autism. **Biochim Biophys Acta** 2013; 1832:431-8.

Renaux-Petel M, Sesboué R, Baert-Desurmont S, et al. The MDM2 285G-309G haplotype is associated with an earlier age of tumour onset in patients with Li-Fraumeni syndrome. **Fam Cancer** 2013 Jul 25. [Epub ahead of print]

Ribeiro RC, Sandrini F, Figueiredo B, et al. An inherited p53 mutation that contributes in a tissue-specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2001; 98:9330-5.

Risch N, Spiker D, Lotspeich L, et al. A genomic screen of autism: evidence for a multilocus etiology. **Am J Hum Genet** 1999; 65:493-507.

Roa BB, Boyd AA, Volcik K, Richards CS. Ashkenazi Jewish population frequencies for common mutations in BRCA1 and BRCA2. **Nat Genet** 1996; 14:185-7.

Robledo C, García JL, Benito R, et al. Molecular Characterization of the Region 7q22.1 in Splenic Marginal Zone Lymphomas. **PLoS One** 2011; 6:e24939.

Ronchi CL, Sbiera S, Leich E, et al. Single nucleotide polymorphism array profiling of adrenocortical tumors evidence for an adenoma carcinoma sequence? **PLoS One** 2013; 8:e73959.

Ruderfer DM, Chambert K, Moran J, et al. Mosaic copy number variation in schizophrenia. **Eur J Hum Genet** 2013; 21:1007-11.

Ruijs MW, Schmidt MK, Nevanlinna H, et al. The single-nucleotide polymorphism 309 in the MDM2 gene contributes to the Li-Fraumeni syndrome and related phenotypes. **Eur J Hum Genet** 2007; 15:110-4.

Saeki H, Kitao H, Yoshinaga K, et al. Copy-neutral loss of heterozygosity at the p53 locus in carcinogenesis of esophageal squamous cell carcinomas associated with p53 mutations. **Clin Cancer Res** 2011; 17:1731-40.

Salmon A, Amikam D, Sodha N, et al. Rapid development of post-radiotherapy sarcoma and breast cancer in a patient with a novel germline 'de-novo' TP53 mutation. **Clin Oncol (R Coll Radiol)** 2007; 19:490-493.

Sandrini R, Ribeiro RC, DeLacerda L. Childhood adrenocortical tumors. **J Clin Endocrinol Metab** 1997; 82:2027-31.

Sandrini R. An inherited p53 mutation that contributes in a tissue-specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2001; 98:9330-5.

Schoemaker MJ, Swerdlow AJ, Higgins CD, Wright AF, Jacobs PA. Mortality in women with turner syndrome in Great Britain: a national cohort study. **J Clin Endocrinol Metab** 2008; 93:4735-42.

Schütz M, Scimemi P, Majumder P, et al. The human deafness-associated connexin 30 T5M mutation causes mild hearing loss and reduces biochemical coupling among cochlear non-sensory cells in knock-in mice. **Hum Mol Genet** 2010; 10:1093.

Sentani K, Oue N, Sakamoto N, et al. Upregulation of connexin 30 in intestinal phenotype gastric cancer and its reduction during tumor progression. **Pathobiology** 2010; 77:241-8.

Severinsen JE, Bjarkam CR, Kiaer-Larsen S, et al. Evidence implicating BRD1 with brain development and susceptibility to both schizophrenia and bipolar affective disorder. **Mol Psychiatry** 2006; 11:1126-38.

Sirnes S, Honne H, Ahmed D, et al. DNA methylation analyses of the connexin gene family reveal silencing of GJC1 (Connexin45) by promoter hypermethylation in colorectal cancer. **Epigenetics** 2011; 6:602-9.

Sharifi M, Salehi R, Gheisari Y, Kazemi M. Inhibition of microRNA miR-92a induces apoptosis and inhibits cell proliferation in human acute promyelocytic leukemia through modulation of p63 expression. **Mol Biol Rep** 2014 Jan 31. [Epub ahead of print]

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

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

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

Silva AG, Achatz IM, Krepischi AC, Pearson PL, Rosenberg C. Number of rare germline CNVs and TP53 mutation types. **Orphanet J Rare Dis** 2012; 7:101.

Silva AG, Ewald IP, Sapienza M, et al. Li-Fraumeni-like syndrome associated with a large BRCA1 intragenic deletion. **BMC Cancer** 2012; 12:237.

Sodha N, Houlston RS, Bullock S, et al. Increasing evidence that germline mutations in CHEK2 do not cause Li-Fraumeni syndrome. **Hum Mutat** 2002; 20:460-2.

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

Stochholm K, Juul S, Juel K, Naeraa RW, Gravholt CH. Prevalence, incidence, diagnostic delay, and mortality in Turner Syndrome. **J Clin Endocrinol Metab** 2006; 91:2897-902.

Sybert VP. Cardiovascular malformations and complications in Turner Syndrome. **Pediatrics** 1998; 101:e11.

Sybert VP, McCauley E. Turner's Syndrome. **N Engl J Med** 2004; 351:1227-38.

Szuhai K, Jennes I, de Jong D, et al. Tiling resolution array-CGH shows that somatic mosaic deletion of the EXT gene is causative in EXT gene mutation negative multiple osteochondromas patients. **Hum Mutat** 2011; 32:E2036-49.

Tabori U, Nanda S, Druker H, Lees J, Malkin D. Younger age of cancer initiation is associated with shorter telomere length in Li-Fraumeni syndrome. **Cancer Res** 2007; 67:1415-8.

Tabori U, Shlien A, Baskin B, et al. TP53 alterations determine clinical subgroups and survival of patients with choroid plexus tumors. **J Clin Oncol** 2010; 28:1995-2001.

Tan MH, Mester JL, Ngeow J, et al. Lifetime cancer risks in individuals with germline PTEN mutations. **Clin Cancer Res** 2012; 18:400-7.

Teichler S, Illmer T, Roemhild J, Ovcharenko D, Stiewe T, Neubauer A. MicroRNA29a regulates the expression of the nuclear oncogene Ski. **Blood** 2011; 118:1899-902.

Tinat J, Bougeard G, Baert-Desurmont S, et al. 2009 version of the Chompret criteria for Li Fraumeni syndrome. **J Clin Oncol** 2009; 27:e108-9.

Toledo F, Wahl GM. Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. **Nat Rev Cancer** 2006; 6:909-23.

Tucker T, Friedman JM. Pathogenesis of hereditary tumors: beyond the "two-hit" hypothesis. **Clin Genet** 2002; 62:345-57.

Tuna M, Knuutila S, Mills GB. Uniparental disomy in cancer. **Trends Mol Med** 2009; 15:120-8.

Vahteristo P, Tamminen A, Karvinen P, et al. p53, CHK2, and CHK1 genes in Finnish families with Li-Fraumeni syndrome: further evidence of CHK2 in inherited cancer predisposition. **Cancer Res** 2001; 61:5718-22.

Varley JM, McGown G, Thorncroft M, et al. Germ-line mutations of TP53 in Li-Fraumeni families: an extended study of 39 families. **Cancer Res** 1997; 57:3245-52.

Varley JM. Germline TP53 mutations and Li-Fraumeni syndrome. **Hum Mutat** 2003; 21:313-20.

Veerappa AM, Vishweswaraiah S, Lingaiah K, et al. Unravelling the complexity of human olfactory receptor repertoire by copy number analysis across population using high resolution arrays. **PLoS One** 2013; 8:e66843.

Viloria CG, Peinado JR, Astudillo A, et al. Human DESC1 serine protease confers tumorigenic properties to MDCK cells and it is upregulated in tumours of different origin. **Br J Cancer** 2007; 97:201-9.

Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. **Nature** 2000; 408:307-10.

Vousden KH, Lane DP. p53 in health and disease. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2007; 8:275-83.

Vulto-van Silfhout AT, Hehir-Kwa JY, van Bon BW, et al. Clinical significance of de novo and inherited copy-number variation. **Hum Mutat** 2013; 34:1679-87.

Wang CC, Liao JY, Lu YS, Chen JW, Yao YT, Lien HC. Differential expression of moesin in breast cancers and its implication in epithelial–mesenchymal transition. **Histopathology** 2012; 61:78-87.

Wang X. miRDB: a microRNA target prediction and functional annotation database with a wiki interface. **RNA** 2008; 14:1012-7.

Wang Y, Han KJ, Pang XW, et al. Large Scale Identification of Human Hepatocellular Carcinoma-Associated Antigens by Autoantibodies. **J Immunol** 2002; 196:1102-9.

Wu CC, Krahe R, Lozano G, et al. Joint effects of germ-line TP53 mutation, MDM2 SNP309, and gender on cancer risk in family studies of Li-Fraumeni syndrome. **Hum Genet** 2011; 129:663-73.

Weissman SM, Bellcross C, Bittner CC, et al. Genetic counseling considerations in the evaluation of families for Lynch syndrome-a review. **J Genet Couns** 2011; 20:5-19.

Wu D, Wu P, Huang Q, Liu Y, Ye J, Huang J. Interleukin-17: a promoter in colorectal cancer progression. **Clin Dev Immunol** 2013; 436307.

Wu M, Liu DY, Yuan XR, et al. The expression of moesin in astrocytoma: correlation with pathologic grade and poor clinical outcome. **Med Oncol** 2013; 30:372.

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

Xu-Monette ZY, Medeiros LJ, Li Y, et al. Dysfunction of the TP53 tumor suppressor gene in lymphoid malignancies. **Blood** 2012; 119:3668-83.

Yang MS, Gill M. A review of gene linkage, association and expression studies in autism and an assessment of convergent evidence. **Int J Dev Neurosci** 2007; 25:69-85.

Yotova IY, Vlatkovic IM, Pauler FM, et al. Identification of the human homolog of the imprinted mouse Air non-coding RNA. **Genomics** 2008; 92:464-73.

Zerdoumi Y, Aury-Landas J, Bonaïti-Pellié C, et al. Drastic effect of germline TP53 missense mutations in Li-Fraumeni patients. **Hum Mutat** 2013; 34:453-61.

Zhang P, Cong B, Yuan H, et al. Overexpression of spindlin1 induces metaphase arrest and chromosomal instability. **J Cell Physiol** 2008; 217:400-8.

Zhang Z, Stiegler AL, Boggon TJ, Kobayashi S, Halmos B. EGFR-mutated lung cancer: a paradigm of molecular oncology. **Oncotarget** 2010; 1:497-514.

Zhu X, Morales FC, Agarwal NK, Dogruluk T, Gagea M, Georgescu MM. Moesin is a glioma progression marker that induces proliferation and Wnt/ b-Catenin pathway activation via interaction with CD44. **Cancer Res** 2013; 73:1142-55.

Zicari AM, Tarani L, Perotti D, et al. WTX R353X mutation in a family with osteopathia striata and cranial sclerosis (OS-CS): case report and literature review of the disease clinical, genetic and radiological features. **Ital J Pediatr** 2012; 38:27.

ANEXOS

Anexo 1 – Carta de aprovação do projeto no Comitê de ética em Pesquisa do AC Cancer Center



Hospital
A.C. Camargo
Centro de Tratamento, Ensino e Pesquisa em Câncer

**Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP**

São Paulo, 21 de dezembro de 2012.

A
Dra. Silvia Regina Rogatto.

Aluna: Tatiane Ramos Basso (Mestrado).

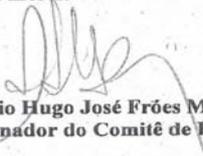
Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1726/12
“Alterações Genômicas em Pacientes Portadores de Múltiplos Tumores Primários que se Enquadram nos Critérios Clínicos da Síndrome de Li-Fraumeni e Li-Fraumeni like, Negativos para Mutações no Gene TP53”.

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 11/12/2012, **aprovaram** a realização do protocolo do estudo em referência (datado de 03 de setembro de 2012) e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

- Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos;
- Termo de Compromisso do Pesquisador com Resoluções do Conselho Nacional de Saúde;
- Termo de Dispensa do Consentimento Livre e Esclarecido;
- Declaração Sobre os Dados Coletados, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração Sobre o Uso e Destino do Material Biológico, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Biobanco do Hospital AC Camargo;
- Declaração Sobre a Publicação dos Dados de Pesquisa Utilizando Amostras Fornecidas e Processadas Pelo Biobanco do Hospital AC Camargo;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Oncogenética do Hospital AC Camargo;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Laboratório de NeoGene do Centro Internacional de Pesquisa (CIPE) do Hospital AC Camargo;
- Declaração de Infraestrutura e Instalações do Centro Internacional de Pesquisa (CIPE) do Hospital AC Camargo;
- Orçamento Financeiro Detalhado.

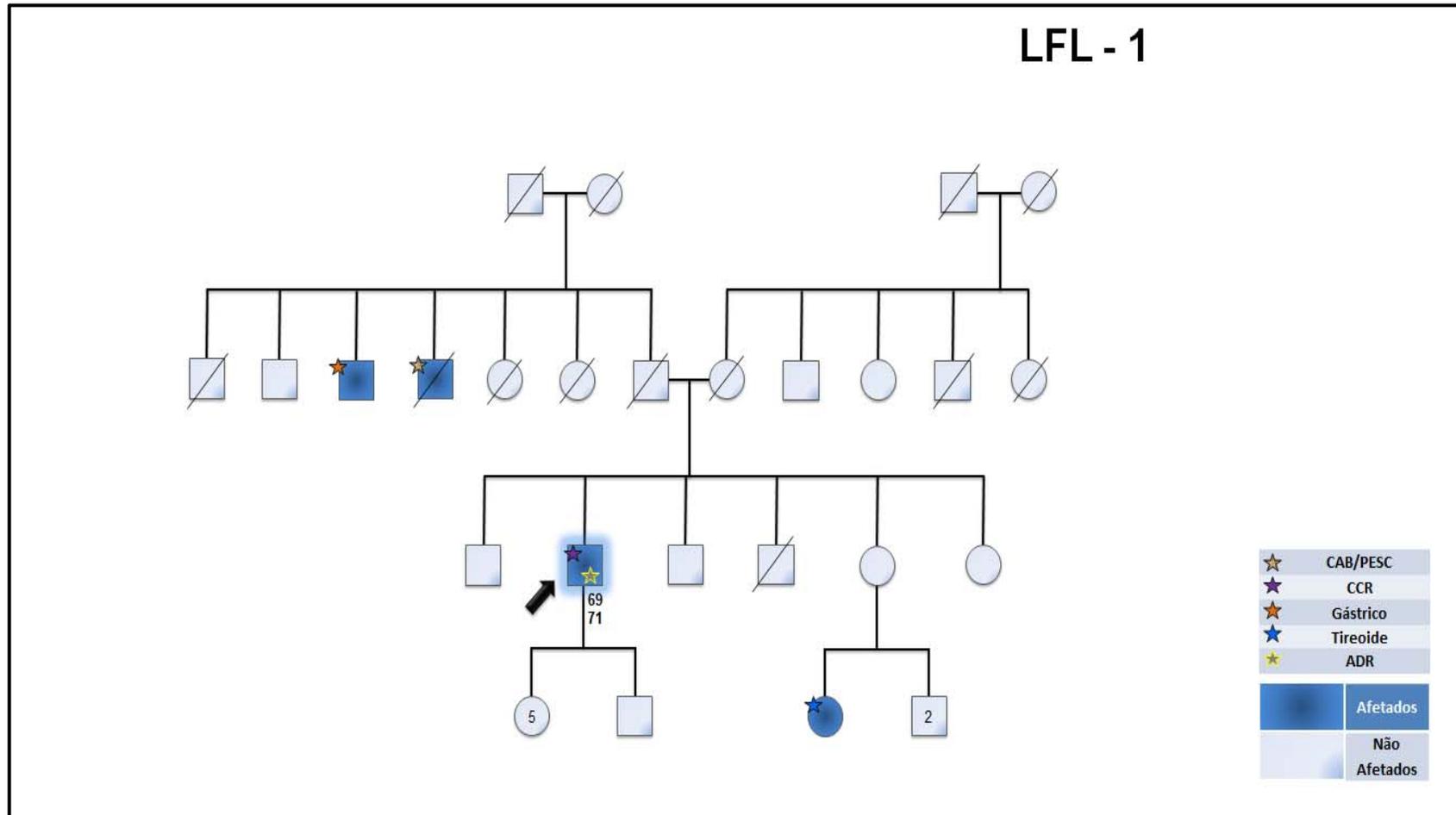
Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas a assistente do CEP dentro de 12 meses.

Atenciosamente,

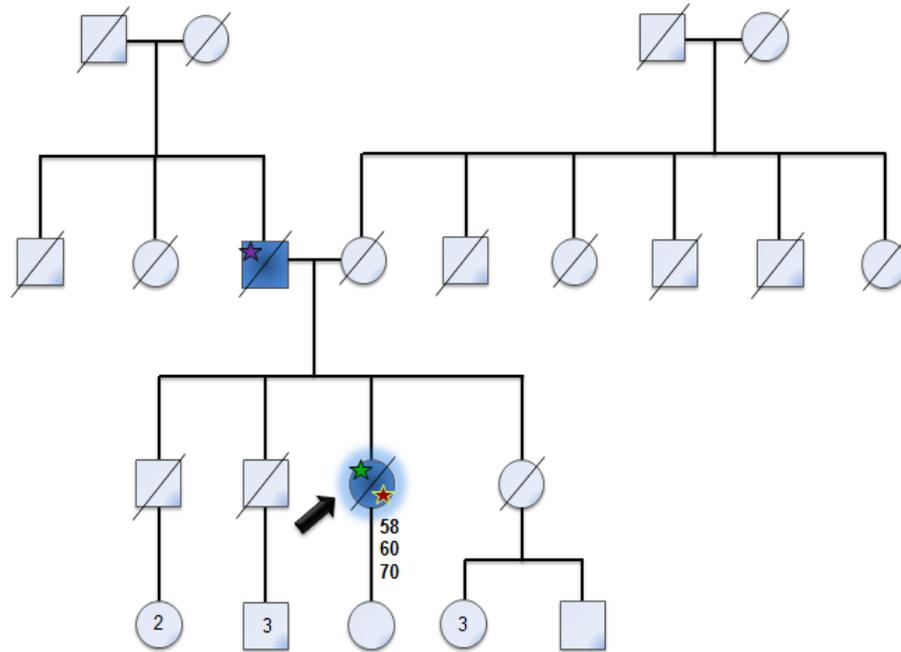

Dr. Antônio Hugo José Frões Marques Campos
2º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

1/1

Anexo 2 – Heredogramas das famílias não apresentados no texto.

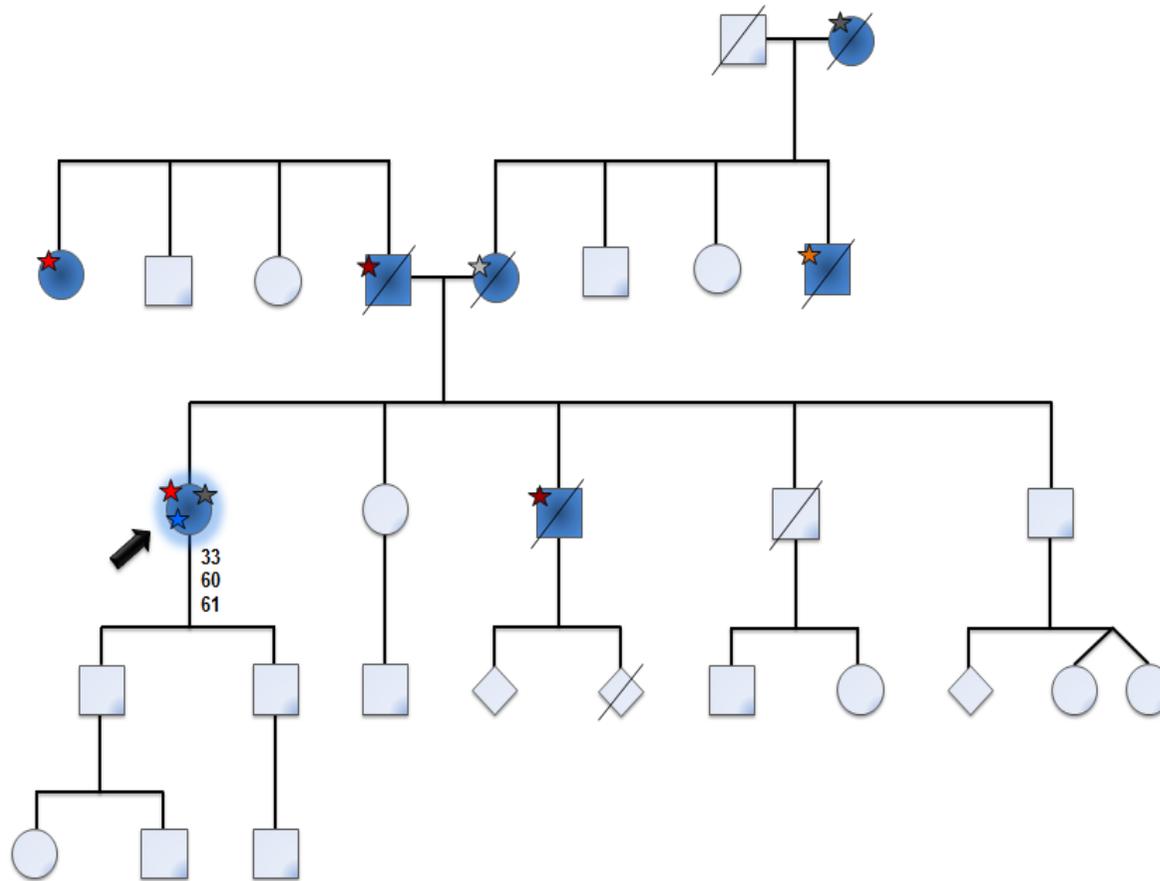


LFL - 2

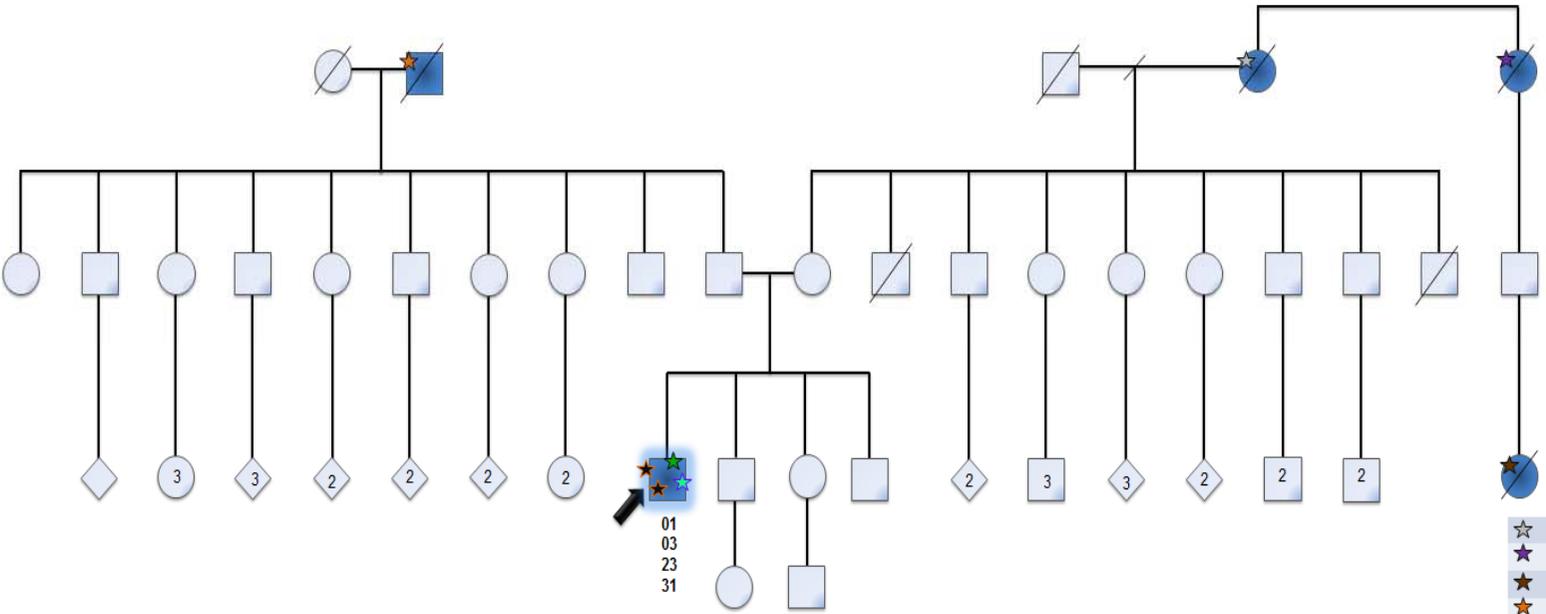


★	CCR
★	SPM
★	Adenoma Supra-Renal
■	Afetados
□	Não Afetados

LFL - 3



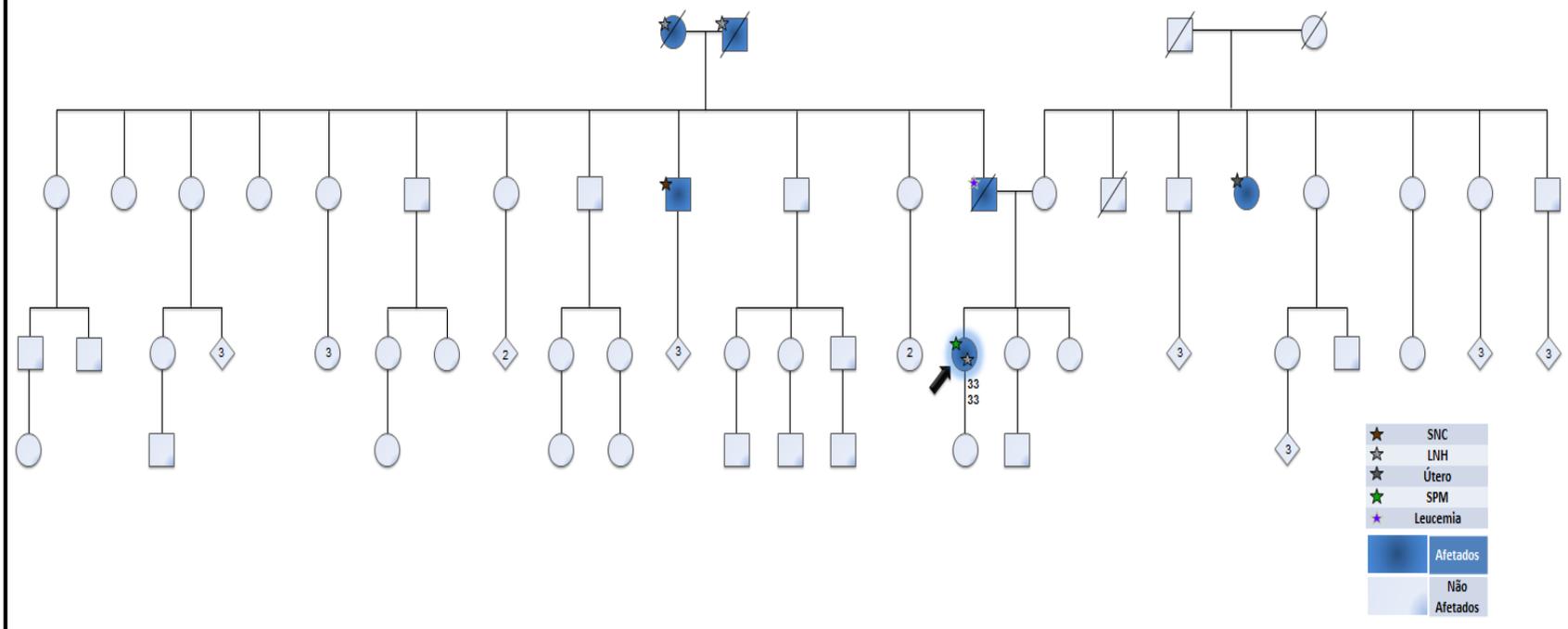
LFL - 5



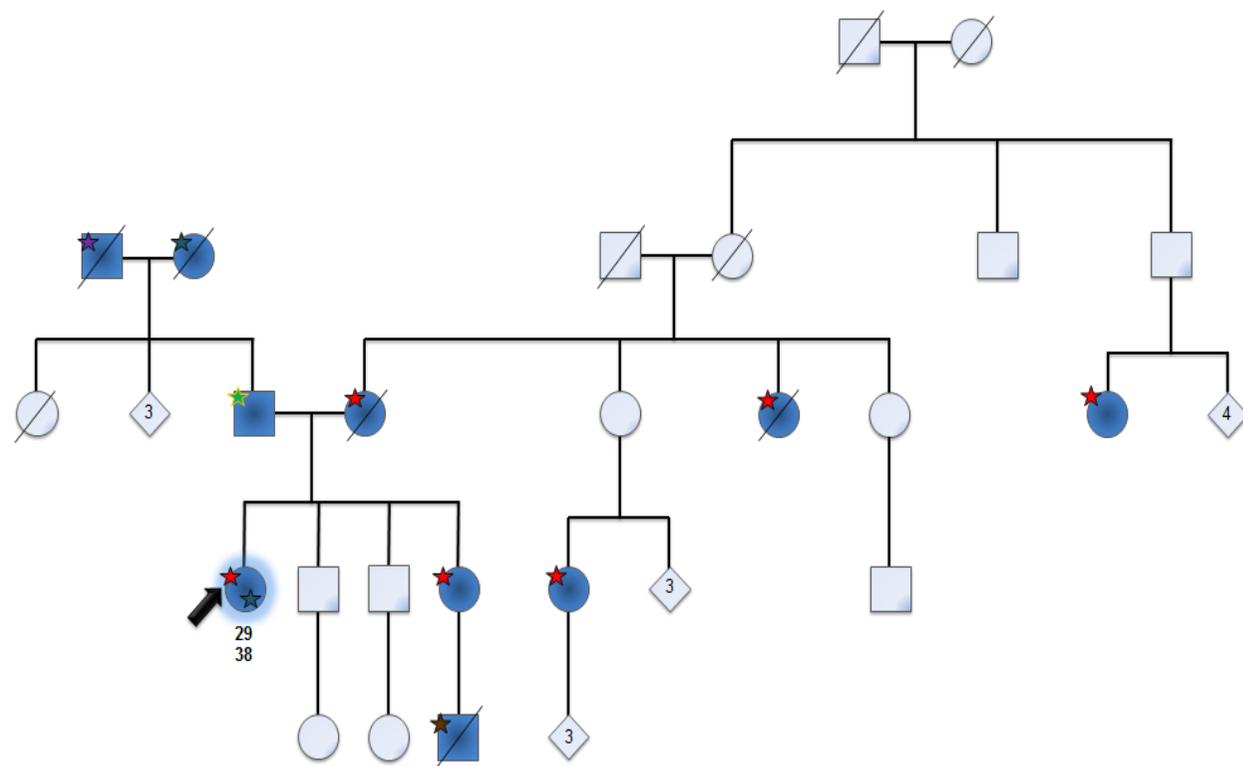
01
03
23
31

☆	Pulmão
★	CCR
★	SNC
★	Gástrico
★	Ósseo
★	SPM
★	Retinoblastoma
■	Afetados
□	Não Afetados

LFL - 7

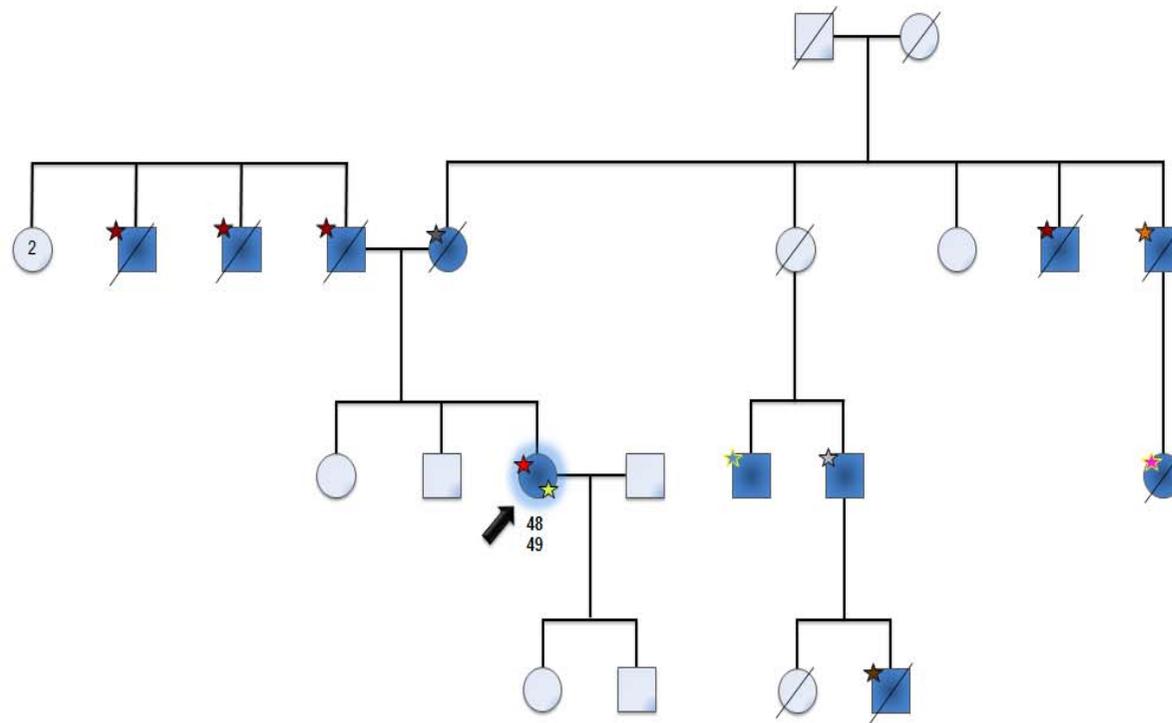


LFL - 9



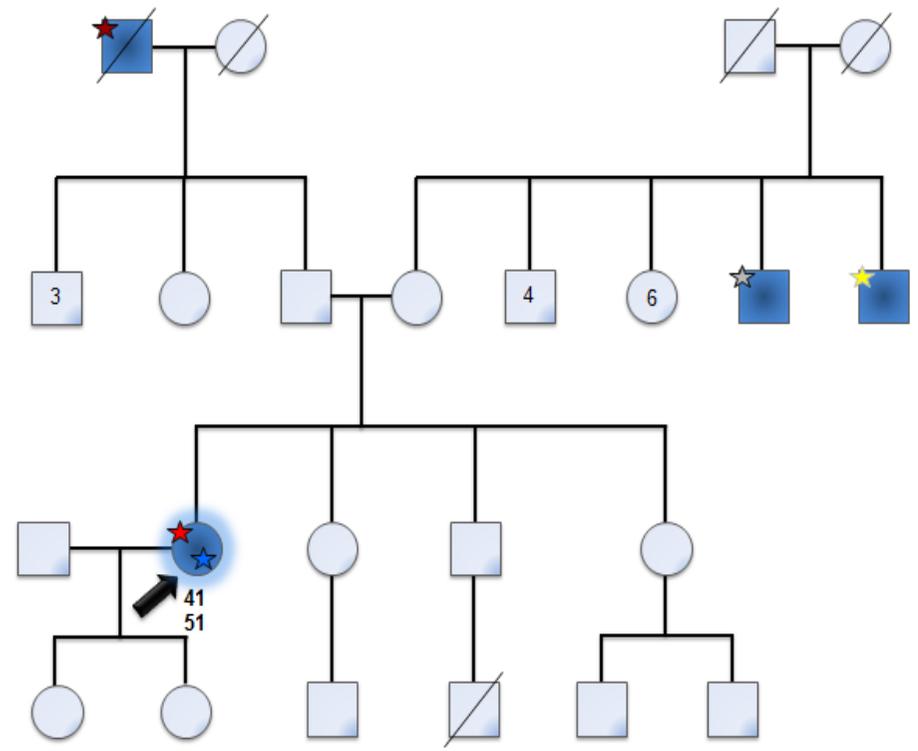
★	Mama
★	SNC
★	Melanoma
★	Renal
★	CCR
■	Afetados
□	Não Afetados

LFL - 10



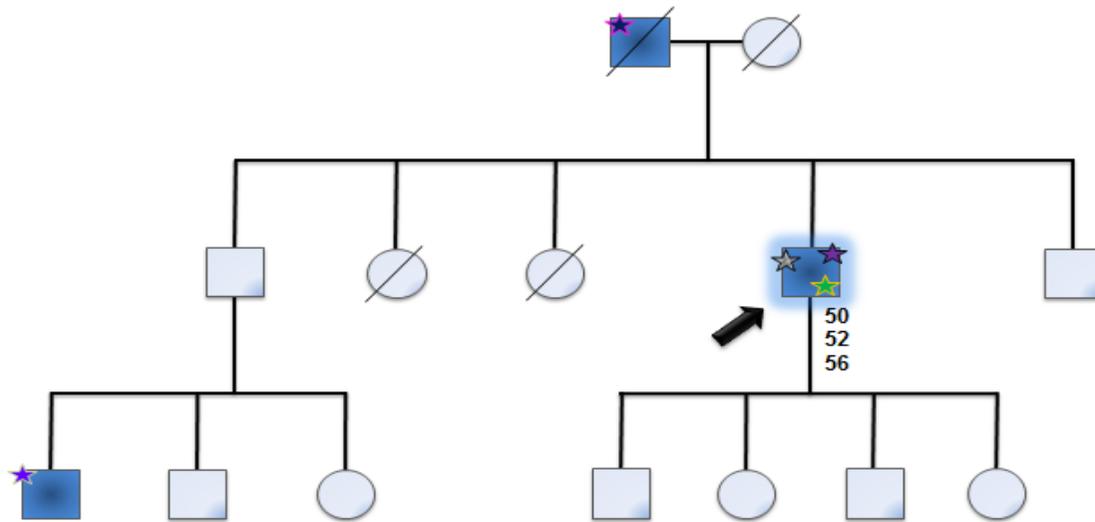
☆	Pulmão
★	Mama
★	SNC
★	Próstata
★	Útero
☆	Endométrio
★	Gástrico
★	Pâncreas
☆	Indeterminado
■	Afetados
□	Não Afetados

LFL - 12



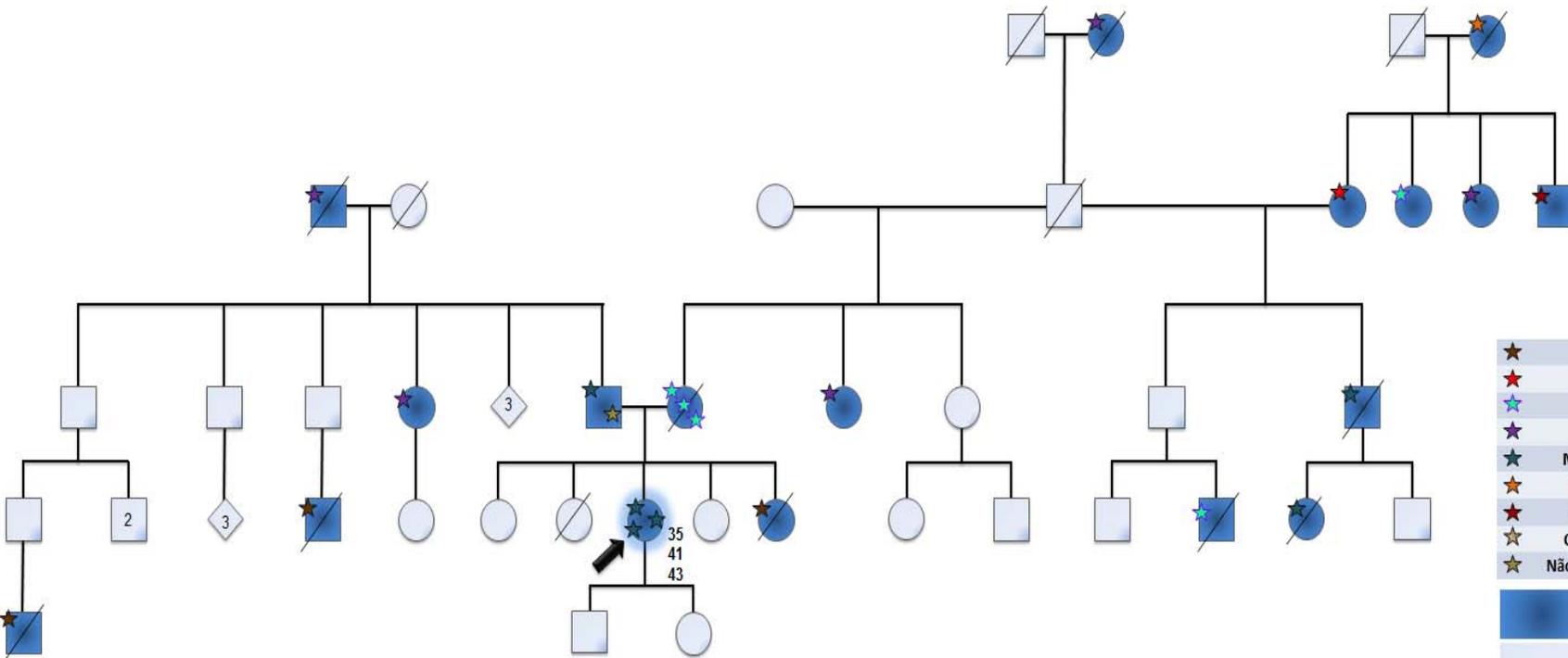
☆	Pulmão
★	Mama
★	Tireoide
★	Próstata
★	Oral
■	Afetados
□	Não Afetados

LFL - 13



★	Leucemia
☆	LNH
★	Renal
★	Esôfago
★	CCR
■	Afetados
○	Não Afetados

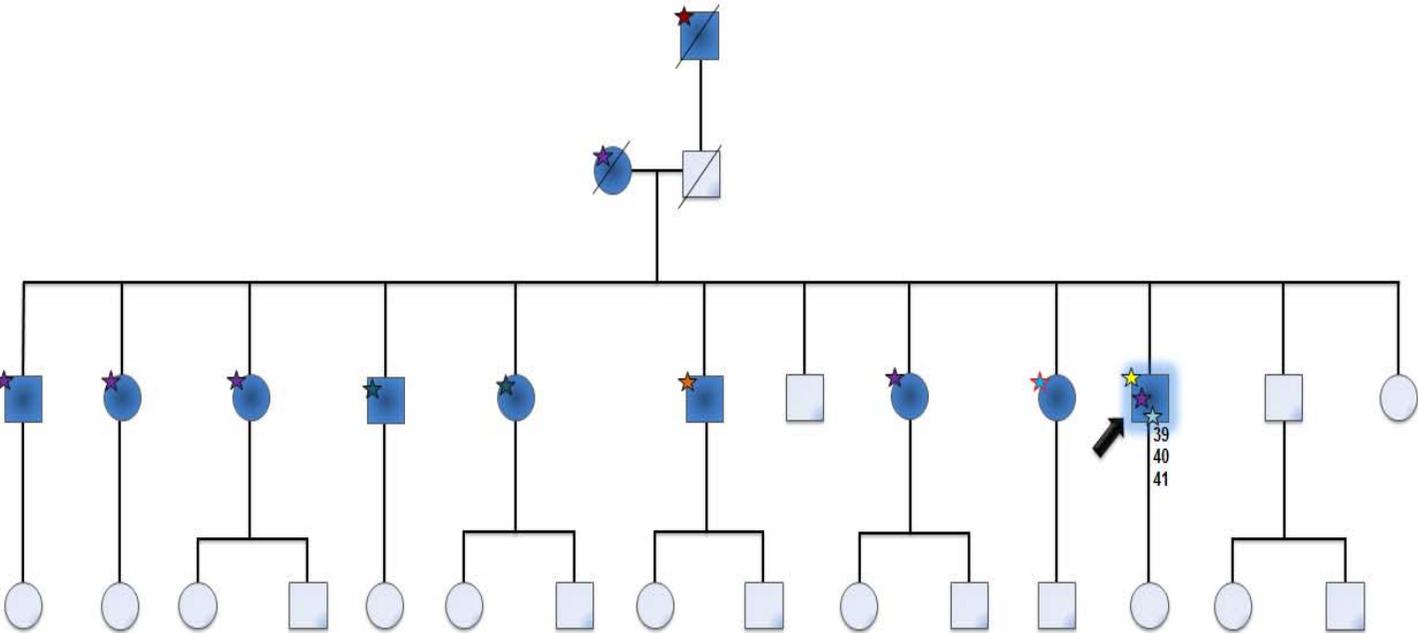
LFL - 15



- ★ SNC
- ★ Mama
- ★ Ósseo
- ★ CCR
- ★ Melanoma
- ★ Gástrico
- ★ Próstata
- ★ Cab./Pesc.
- ★ Não-Melanoma

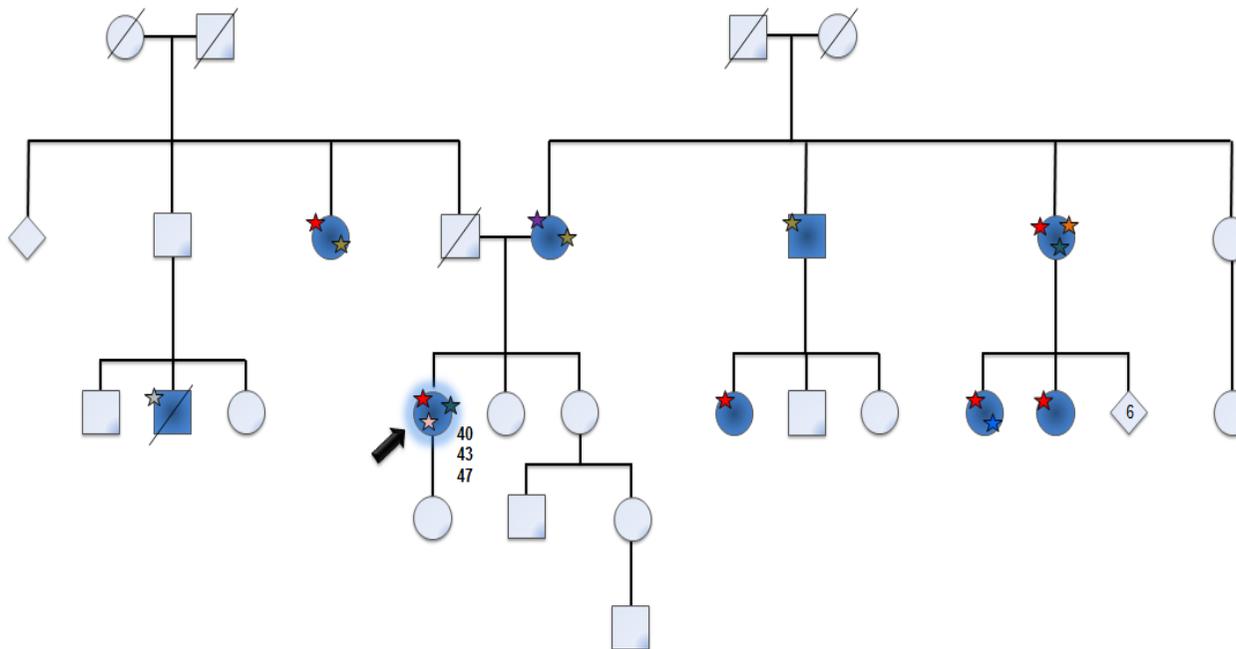
■	Afetados
□	Não Afetados

MT - 1



★	CCR
★	Próstata
★	Melanoma
★	Gástrico
★	Intestino Delgado
★	CEC (Tórax)
★	Ceco
■	Afetados
□	Não Afetados

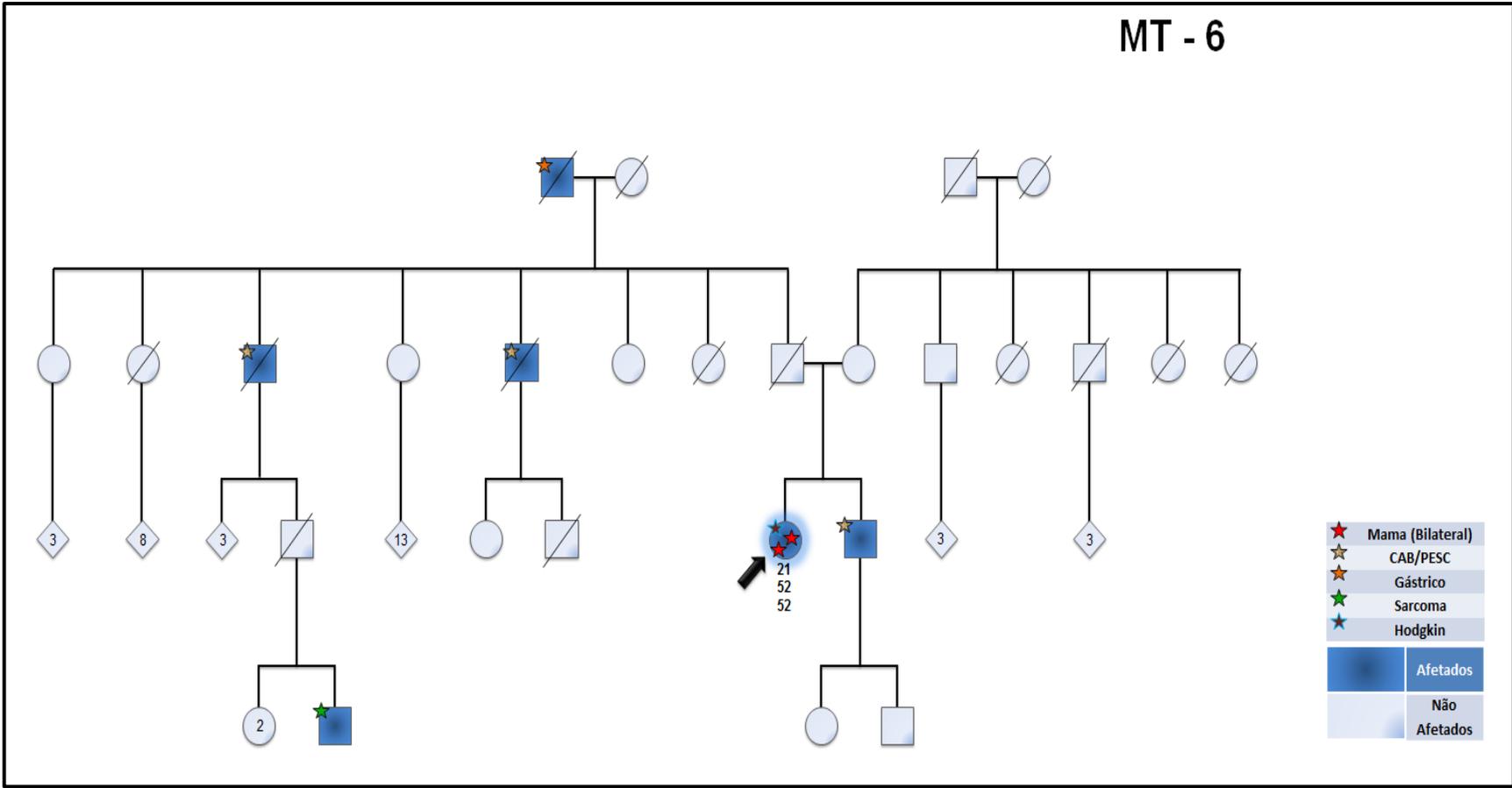
MT - 3



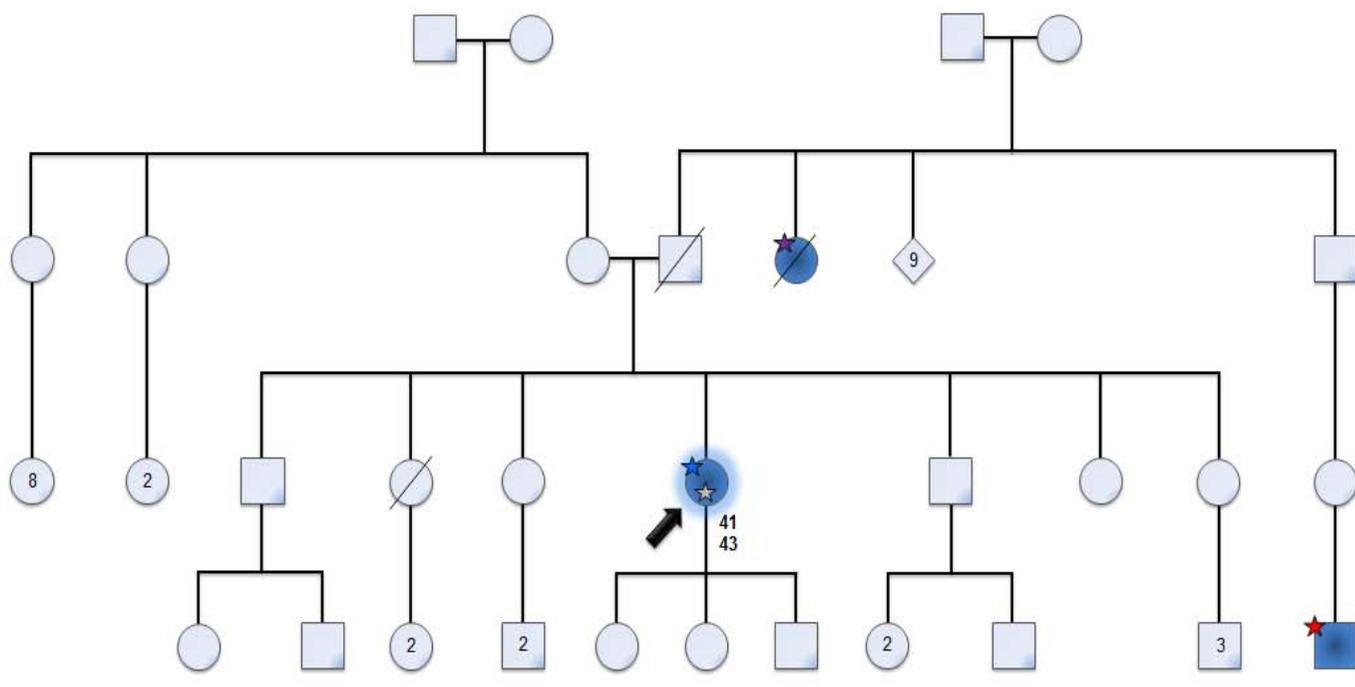
- ☆ Pulmão
- ★ Mama
- ★ CCR
- ★ Melanoma
- ★ Não-Melanoma
- ★ Bexiga
- ★ Gástrico
- ★ Tireoide

Afetados
Não Afetados

MT - 6

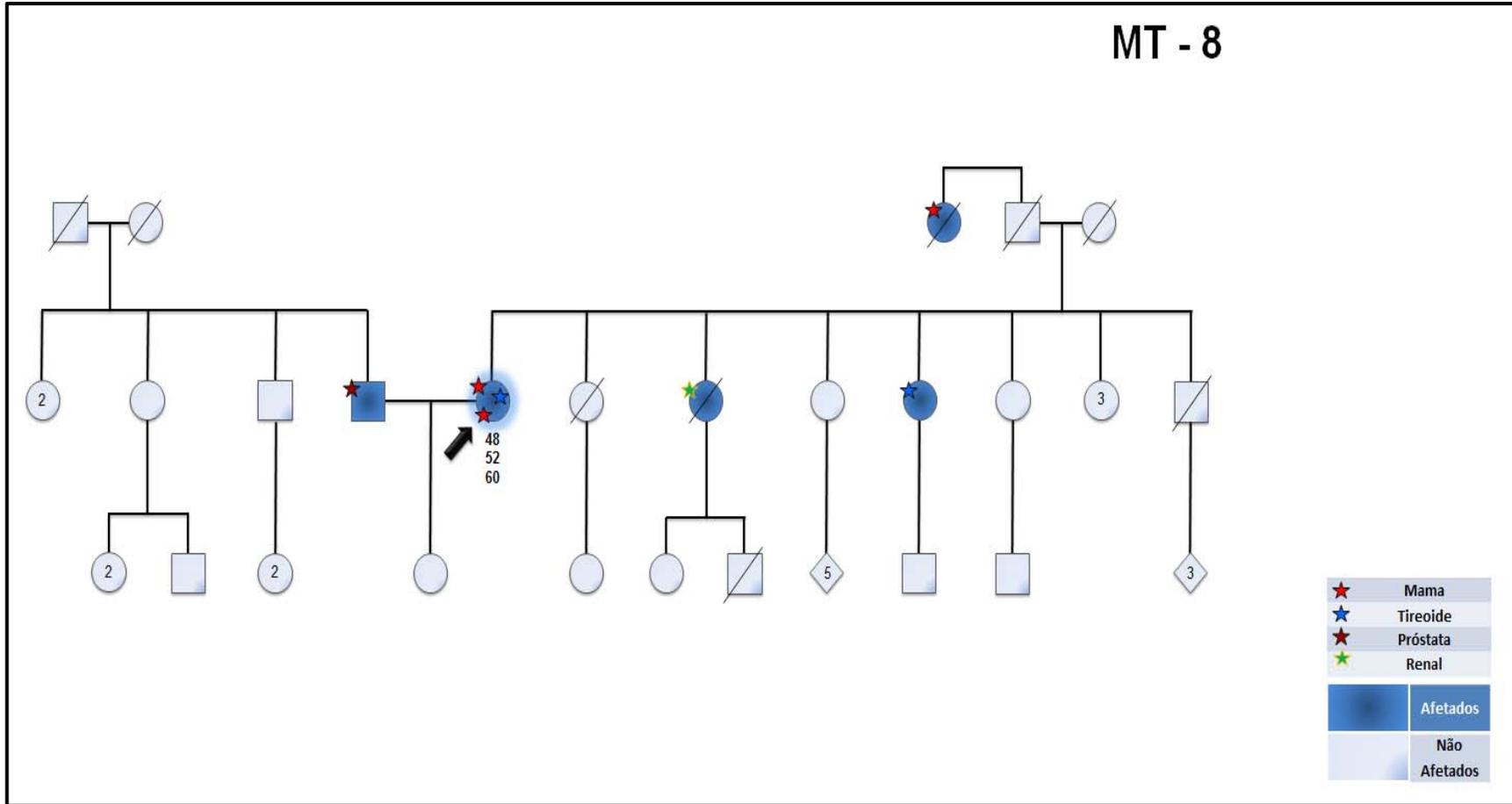


MT - 7

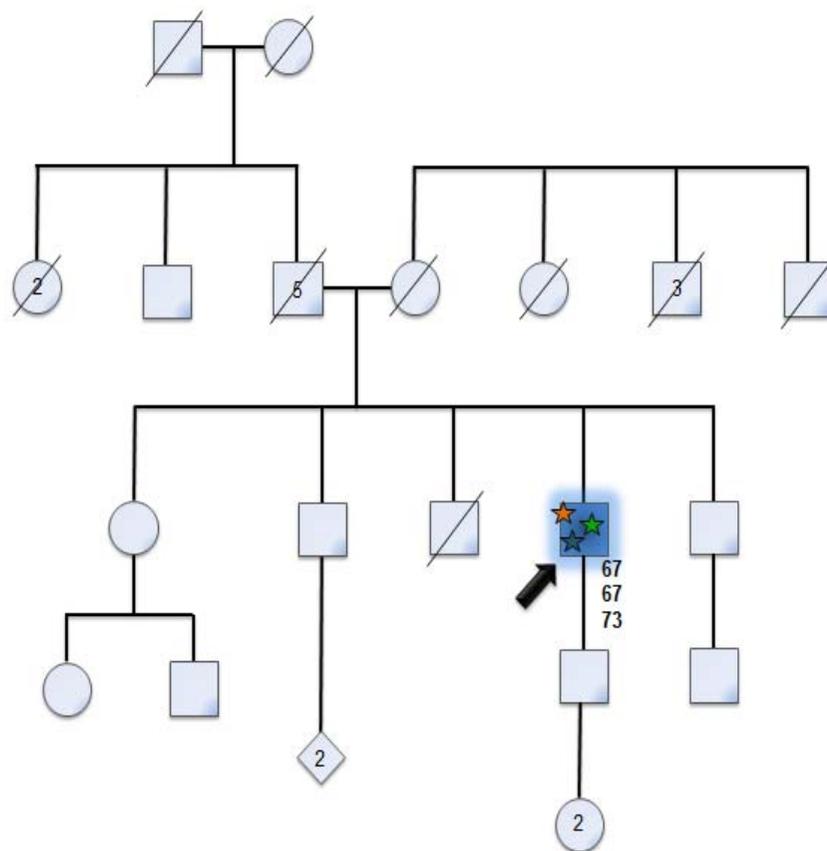


☆	Pulmão
★	Mama
★	CCR
★	Tiroide
■	Afetados
○	Não Afetados

MT - 8

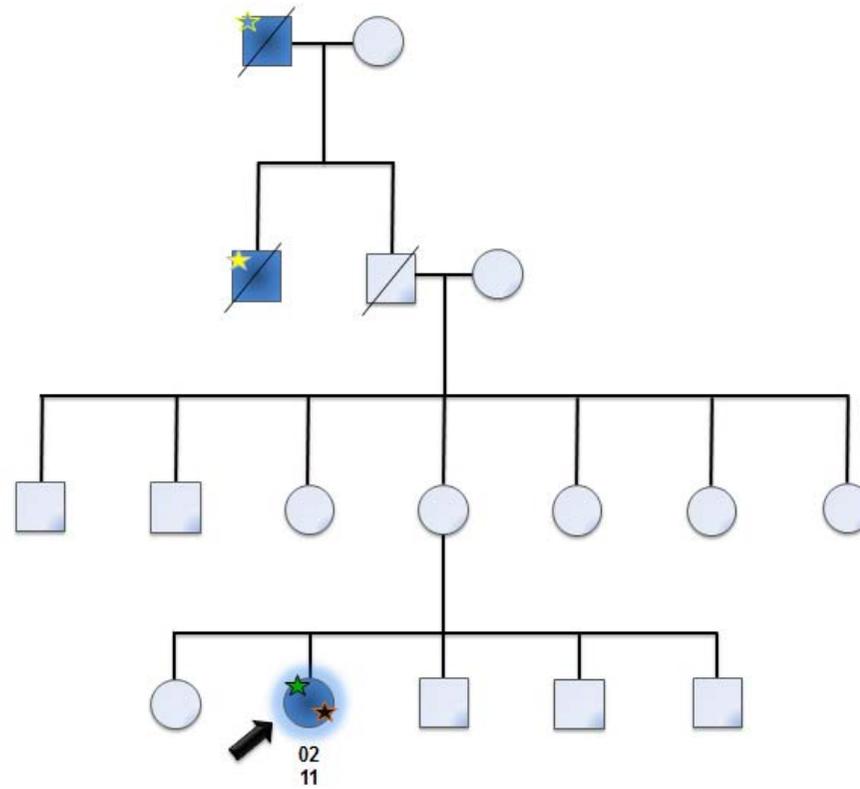


MT - 11



★	Melanoma
★	Gástrico
★	SPM
■	Afetados
□	Não Afetados

MT - 12



MT - 15

