

**INVESTIGAÇÃO DE FATORES GENÉTICOS NA
ETIOLOGIA DA SÍNDROME DO MELANOMA
FAMILIAL: *COPY NUMBER VARIATIONS* (CNV) E
SEQUENCIAMENTO DE EXOMA**

FELIPE FIDALGO DE CARVALHO

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

Área de Concentração: Oncologia

Orientadora: Dra. Ana Cristina Victorino Krepischi

Co-orientadora: Dra. Dirce Maria Carraro

São Paulo

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Carvalho, Felipe Fidalgo de

Investigação de fatores genéticos na etiologia da síndrome do melanoma familiar: copy number variations (CNV) e sequenciamento de exoma / Felipe Fidalgo de Carvalho – São Paulo 2016.

112p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientadora: Ana Cristina Victorino Krepschi

Descritores: 1. MELANOMA/genética. 2. SEQUENCIAMENTO DE NUCLEOTÍDEOS EM LARGA ESCALA. 3. VARIAÇÕES DO NÚMERO DE CÓPIAS DE DNA. 4. HEREDITARIEDADE/genética. 5. EXOMA.

DEDICATÓRIA

Esse trabalho é dedicado a minha mãe e a minha avó que sempre me deram suporte, força e amor em todos os momentos da minha vida, a minha família e aos meus amigos, especialmente meu irmãozão que não está mais entre nós, Erick Augusto da Silva (o irmão mais velho que eu nunca tive).

Além disso, dedico esse trabalho a todos os pacientes e famílias que concordaram em participar de projetos de pesquisa e que tornam possíveis os avanços da ciência. E espero que meu trabalho abra portas em benefício dessas pessoas.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus e a vida, que me deram todas essas oportunidades até hoje e me permitem acordar todos os dias para dar mais um passo em busca dos meus objetivos.

Agradeço minha mãe, sempre presente, nos dias bons e ruins. Você é a minha maior fonte de inspiração e de amor e sempre estarei ao seu lado. Obrigado por me educar, por me mostrar o caminho do bem e por sempre acreditar em mim. Te amo mainha!

Agradeço minha avó que hoje é um anjo da guarda que me guia e olha por mim aonde quer que eu vá. Mulher que sempre me ensinou que devemos ter fé sempre, independente da situação, e que devemos nos levantar e ter força sempre para conquistar o que desejamos. Muito obrigado por cuidar de mim e ter depositado todo amor que a Senhora tinha em mim. Sempre vou te amar e te admirar veínha!

Agradeço muitíssimo a Ana, minha orientadora, que ao longo desses últimos 6 anos acreditou em mim e me deu essas oportunidades. Obrigado pela paciência, pela força, pela fé em mim, pelas chances, pelas broncas. Obrigado por ter me dado a chance de eu me desenvolver e conquistar esses objetivos. Serei eternamente grato por tudo! Conseguimos!!!

Aos amigos de grupo, Dimitrius, Érica e Talita pelo companheirismo durante essa caminhada, pela cia. muitíssimo agradável, pelas piadinhas e por não me deixarem só, pelo menos nas reuniões de quarta, quando eu ostentava que também tinha um grupo hahaha. Obrigado!!!

Tati Rodrigues!!! Parceiraça sempre presente nessa jornada, em congressos, reuniões, experimentos, mais congressos, na pipetagem de placa 384 na mão. Enfim, valeu parça!! Tu é sensacional!!! Obrigado!!! Os: me arruma um emprego! hahaha

Agradeço aos meus amigos/irmãos. Pela lealdade, amor, carinho, e claro, as zoeiras sem limites. O que seria da minha pessoa sem vocês, cara!!??? Vocês são incríveis!!!

Dedico e agradeço também a um grande amigo que infelizmente não faz mais parte desse plano, o cara que eu chamava de irmão mais velho que nunca tive e que sempre admirei. Obrigado pelo tempo que estivemos juntos nessa vida brother!!! Você sempre foi um dos maiores incentivadores da minha caminhada e sempre acreditou muito em mim e no que eu fazia. Obrigado por ensinar pra mim e pra toda nossa galera que pra vencer tem que se jogar de cabeça naquilo que se quer, que tem que ter fé e persistência e nunca passar por cima de ninguém. Essa vitória também tem um Q de EriQUÊ!!!

Agradeço a todos meus amigos do CIPE que ao longo desses anos fizeram cada dia de lab muito mais proveitosos e que me fazem agora ter que sair com o coração na mão, com aquele nózinho na garganta da saudade de ver vocês todos os dias e rir nas horas do café, na sinuquinha do Geva, no Marquês antes das 7 pra não pagar a entrada. Enfim, vocês são incríveis e com certeza tenho muito orgulho de dizer que trabalhei com vocês pelas pessoas que são.

Agradeço a minha co-orientadora, Dra. Dirce Carraro e a Dra. Bruna Barros, por terem me ajudado muito com os sequenciamentos. Por me ensinarem a técnica e teoria da mesma. Desculpem por algumas reações que não deram certo, mas no fim deu tudo certo! rs

Agradeço toda equipe do Departamento de Oncologia Cutânea, principalmente Dr. João Duprat-Neto, Luciana Facure e Dr. Elimar que foram colaboradores valiosos neste trabalho e nos artigos publicados a partir do mesmo.

Agradeço muito também a Dra. Maria Isabel Achatz e a enfermeira de pesquisa Amanda França pela valiosíssima contribuição na seleção dos pacientes e das famílias para a execução desse projeto.

Agradeço demaaaaais a Suely, da biblioteca, pela enorme ajuda na hora de configurar a tese e consertar todos os erros de formatação e de referências!!! Sem você minha tese estaria muito torta! Hahaha... Você é demais!!! MUITÍSSIMO obrigado mesmo!!!

RESUMO

Carvalho FF. **Investigação de fatores genéticos na etiologia da síndrome do melanoma familiar: copy number variations (CNV) e sequenciamento de exoma.** São Paulo; 2016. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

O melanoma é um tipo raro e agressivo de câncer de pele e a maioria dos casos é esporádica. Entretanto, alguns indivíduos da população apresentam alta predisposição ao desenvolvimento de tipos específicos de câncer em decorrência da presença de mutações germinativas e/ou variantes genômicas de risco. Aproximadamente 10% dos casos de melanoma cutâneo são causados por mutações germinativas, em especial no *locus CDKN2A*, responsável por até 40% do melanoma familiar. Outros genes com mutações germinativas altamente penetrantes já foram descritos no melanoma, como *CDK4*, *POT1*, *TERT*, entre outros, mas tais mutações são detectadas em pouquíssimas famílias. Portanto, a etiologia genética da maior parte da predisposição ao melanoma cutâneo permanece não determinada. O objetivo central deste trabalho foi a identificação de variantes genômicas raras associadas à suscetibilidade ao melanoma cutâneo em pacientes negativos para mutações nos principais genes conhecidos. Dois tipos de abordagens metodológicas foram empregadas: o estudo de variações do número de cópias de segmentos genômicos (*Copy Number Variation - CNV*) e sequenciamento de exoma. A análise de CNV foi realizada em uma casuística constituída por um grupo de 41 pacientes de melanoma cutâneo não relacionados (selecionados como melanoma familiar e/ou melanomas múltiplos), sem mutações nos genes de predisposição a melanoma *CDKN2A*, *CDK4*, *MITF* e *TERT*. Identificamos 10 CNVs raras não recorrentes, distribuídas em 9 dos pacientes (22% da coorte). Todas as CNVs foram validadas pela técnica de PCR quantitativo em tempo real (qPCR) e, adicionalmente, não foram detectadas em um grupo controle de 400 indivíduos. As CNVs detectadas afetam segmentos genômicos grandes (>200 Kb), compreendendo 3 deleções (2q33.3-q34, 6p24.3 e 10q22.3) e 7 duplicações (6p22.1, 10q22.3, 12p12.3, 20p12.1, 4q26-q27, 8q23.1 e 9p24.2). Dentre os genes afetados pela mudança no número de cópias, os principais genes candidatos à predisposição ao melanoma cutâneo são *IDH1*, *ANXA11* e *ANGPT1*. Na segunda parte deste trabalho, um subgrupo de cinco famílias de melanoma familiar, sendo 2

membros afetados de cada família e negativos para CNVs raras foram selecionados para o sequenciamento de exoma. Selecionamos apenas variantes genômicas não-sinônimas que fossem raras na população geral (frequência < 0,01%) segundo bancos de dados populacionais e que estivessem presentes nos dois afetados da família; dessa forma, foram identificadas um total de 214 variantes genômicas raras não-sinônimas em 210 genes. Dentre essas, 63 foram consideradas danosas à função proteica, segundo algoritmos de predição. Oito variantes ocasionam perda de função proteica (LoF – loss-of-function). Entre os 210 genes afetados, os genes *MYO7A* e *WRN*, já foram previamente associados à predisposição ao melanoma cutâneo. Adicionalmente, o grupo de genes identificados no exoma está associado a diferentes fenótipos como melanoma (*ITGA3*, *RECK*, *ADAMTS4*, *TYMP* e *MCM3*), pigmentação e pele (*COL4A2*, *HPS5*, *MLPH*, *VNN2*, *NID2*, *SLIT2* e *HMCN1*), além de suscetibilidade a câncer em geral (*ZFHX3* e *CTBP2*). Em conclusão, nossos dados revelaram alterações germinativas raras em pacientes de melanoma familiar e/ou melanomas múltiplos, como CNVs e mutações potencialmente patogênicas. Este estudo, portanto, identificou novos fatores genéticos de suscetibilidade ao melanoma cutâneo na população brasileira, contribuindo com vários genes candidatos a serem explorados em futuros trabalhos.

SUMMARY

Carvalho FF. **[Investigation of genetic factors on the familial melanoma syndrome etiology: copy number variations (CNV) and exome sequencing]**. São Paulo; 2016. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Melanoma is a rare and aggressive kind of skin cancer and sporadic on the most cases. However, some people of the population shows high predisposition to development of specific types of cancer due germline mutations and/or genomic variants of risk. Approximately 10% of all cases of melanoma are caused by germline mutations, specially affecting the *CDKN2A* locus, which responds up to 40% of familial melanoma cases. Other genes harboring penetrant mutations were already described in hereditary melanoma such as *CDK4*, *POT1*, *TERT*, among others, but these mutations are identified in few families. Therefore, the most part of genetic etiology to cutaneous melanoma predisposition remains not elucidated. The main objective of this work was to identify rare genomic variants associated to the cutaneous melanoma susceptibility in melanoma-prone patients negative for mutations at the main genes associated to this syndrome. Two kinds of methodological approaches were applied: the assess to genomic segments of copy number variations (CNV) through high resolution SNP-arrays and exome sequencing. The cohort of hereditary melanoma was composed by 41 not-related cutaneous melanoma patients, without mutations affecting genes of melanoma predisposition *CDKN2A*, *CDK4*, *MITF* and *TERT*. We identified 10 not recurrent rare CNVs in 9 patients (22% of our cohort). All CNVs were validated using the quantitative real-time PCR (qPCR) and were not detected in a control group of 400 individuals. These CNVs affected large genomic segments (>200 Kb), comprising 3 deletions (2q33.3-q34, 6p24.3 e 10q22.3) and 7 duplications (6p22.1 10q22.3 12p12.3 20p12.1, 4q26-q27, 8q23.1 e 9p24.2). From this analysis the main candidate genes were: *IDH1*, *ANXA11* e *ANGPT1*. The exome sequencing was performed in a subset of 5 melanoma-prone families; 2 members affected by melanoma from each family without rare CNVs. We selected non-synonymous genomic variants following 2 main criteria: rarity on population (frequency <0.1%) and common variants

between patient and their affected relative. We identified a total of 214 non-synonymous rare genomic variants in all families affecting 210 genes, which 63 were considered damaging to protein function according to prediction algorithms and 8 leads to loss-of-function (LoF). Between the 210 affected genes, were highlighted variants affecting the *MYO7A* and *WRN* genes which were previously associated to melanoma predisposition. Additionally, the set of genes identified by exome sequencing also showed relevance once are associated to melanoma phenotypes (*ITGA3*, *RECK*, *ADAMTS4*, *TYMP* and *MCM3*), skin and pigmentation (*COL4A2*, *HPS5*, *MLPH*, *VNN2*, *NID2*, *SLIT2* and *HMCN1*) and cancer susceptibility (*ZFHX3* and *CTBP2*). In conclusion, our data revealed rare germline alterations in familial and/or multiple melanomas, such as CNV and potential pathogenic mutations. Therefore, this study identified new genetic factors of susceptibility to cutaneous melanoma on the Brazilian population, contributing with a set of candidate genes to be deeply explored in further studies.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Características adquiridas por uma célula maligna tumoral.....	2
Figura 2	Melanócitos.....	4
Figura 3	Imagens dos principais subtipos de melanoma cutâneo.....	5
Figura 4	Resposta ao dano ao DNA causado pela radiação UV; síntese de melanina.....	6
Figura 5	Modelo de Clark. Progressão de melanócitos normais para melanoma e correlação com alterações genéticas em cada etapa...	8
Figura 6	Genes de predisposição a câncer.....	15
Figura 7	Gráfico obtido a partir de dados de eletroforese em BioAnalyzer, mostrando o resultado da fragmentação de seis amostras de DNA, com pico entre 100-300pb, tamanho ideal dos fragmentos para nosso protocolo.....	62
Figura 8	Exemplo de imagem gerada no Ion Proton Sequencer mostrando a porcentagem (87% - escala à direita) de poços do chip que estavam preenchidos com ISPs, contendo fragmentos que foram sequenciados.....	64
Figura 9	O gráfico mostra o histograma de distribuição do tamanho dos fragmentos que foram sequenciados, evidenciando que a maioria deles tinha entre 150 e 250 pb.....	65
Figura 10	O gráfico mostra a porcentagem de <i>reads</i> que foram alinhadas corretamente ao genoma de referência (93% - azul) e as <i>reads</i> não alinhadas (7% - roxo), distribuição considerada satisfatória.....	66

Figura 11	Redes de interação dos genes identificados com variantes raras nos pacientes com predisposição a melanoma.	74
Figura 12	Heredograma representando a Família 1.....	75
Figura 13	Heredograma representando a Família 2.....	77
Figura 14	Heredograma representando a Família 3.....	79
Figura 15	Heredograma representando a Família 4.....	81
Figura 16	Heredograma representando a Família 5.....	83
Figura 17	Rede dos genes que associados a câncer, doenças dermatológicas, anormalidades e injúrias do organismo.....	86
Figura 18	Frequência de alteração dos genes alterados em pelo menos 20% de melanomas do estudo TCGA (<i>The Cancer Genome Atlas</i>).....	88

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1	Bancos de dados utilizados para anotação das CNVs identificadas.....	33
Quadro 2	Ciclagem utilizada para a amplificação dos fragmentos de DNA.....	36
Quadro 3	Bancos de dados utilizados para anotação das variantes identificadas.....	41
Quadro 4	Características clínicas dos 10 pacientes selecionados para o sequenciamento de exoma.....	61
Quadro 5	Sequência dos adaptadores ligados a cada amostra.....	63
Quadro 6	Variantes raras germinativas causadoras de LoF (Loss-of-Function) identificadas por sequenciamento de exoma nos 5 pares de pacientes afetados por melanoma.....	70
Quadro 7	Variantes raras (frequência <0,1%) associadas aos fenótipos pesquisados: melanoma, pigmentação de pele e suscetibilidade a câncer e/ou melanoma.....	72
Quadro 8	Genes com variantes raras (frequência <0,1%) categorizadas como possivelmente patogênicas de acordo com mínimo de três diferentes algoritmos (SIFT, Polyphen2, LRT, Mutation Taster, Mutation Assessor e FATHMM), identificadas na Família 1.....	76
Quadro 9	Genes com variantes raras (frequência <0,1%) categorizadas como possivelmente patogênicas de acordo com mínimo de três diferentes algoritmos (SIFT, Polyphen2, LRT, Mutation Taster, Mutation Assessor e FATHMM), identificadas na Família 2.....	78

Quadro 10	Genes com variantes raras (frequência <0,1%) categorizadas como possivelmente patogênicas de acordo com mínimo de três diferentes algoritmos (SIFT, Polyphen2, LRT, Mutation Taster, Mutation Assessor e FATHMM), identificadas na Família 3.....	80
Quadro 11	Genes com variantes raras (frequência <0,1%) categorizadas como possivelmente patogênicas de acordo com mínimo de três diferentes algoritmos (SIFT, Polyphen2, LRT, Mutation Taster, Mutation Assessor e FATHMM), identificadas na Família 4.....	82
Quadro 12	Genes com variantes raras (frequência <0,1%) categorizadas como possivelmente patogênicas de acordo com mínimo de três diferentes algoritmos (SIFT, Polyphen2, LRT, Mutation Taster, Mutation Assessor e FATHMM), identificadas na Família 5.....	82
Quadro 13	Genes com mutações de alta penetrância associadas à predisposição ao melanoma cutâneo.....	91
Tabela 1	Descrição dos dados de sequenciamento de exoma de cada amostra de DNA genômico de 10 pacientes de melanoma hereditário: um par de indivíduos afetados de cada família.....	67
Tabela 2	Variantes raras não-sinônimas que co-segregam em dois afetados de cada uma das cinco diferentes famílias.....	69
Tabela 3	Funções celulares e doenças associadas aos 63 genes nos quais variantes raras não-sinônimas foram consideradas como possivelmente danosas por no mínimo 3 diferentes algoritmos de predição de dano proteico.....	85

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

µg	micrograma
µl	microlitro
3'UTR	<i>Three prime untranslated region</i>
5'UTR	<i>Five prime untranslated region</i>
ACCCC	AC Camargo Cancer Center
array-CGH	Hibridização genômica comparativa em microarranjos
cAMP	AMP cíclico
dbNSFP	<i>database for nonsynonymous SNPs' functional predictions</i>
DGV	<i>Database of Genomic Variants</i>
DNA	Ácido desoxirribonucléico
FS	<i>strand bias</i>
GPC	genes de predisposição a câncer
GWAS	<i>Genome-wide association studies</i>
IPA	<i>Ingenuity Pathway Analysis</i>
ISP	<i>Ion Sphere Particle</i>
Kb	Kilobase
lncRNA	<i>Long non-coding RNA</i>
LOH	Perda de heterozigose
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
Mb	Megabase
MC1R	<i>melanocortin 1 receptor</i>
miRNA	microRNA
MLPA	amplificação multiplex de sondas dependente de ligação
mRNA	RNA mensageiro
MSH	Melanocyte-stimulating hormone
NaOH	Hidróxido de Sódio
ng	nanograma
NGS	<i>Next generation sequencing</i>

°C	grau Celsius
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
pb	par de base
PI3K	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>
pM	picomolar
POMC	Proopiomelanocortina
QD	<i>quality by depth</i>
qPCR	Reação em cadeia polimerase em tempo real quantitativo
RNA	Ácido ribonucléico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
snoRNA	<i>Small nucleolar RNA</i>
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
SNV	<i>Single nucleotide variant</i>
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
tRNA	RNA transportador
UPD	Dissomia uniparental
UV	Radiação ultravioleta

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1.	Melanoma cutâneo	3
1.1.1	Fatores de risco do melanoma cutâneo	5
1.1.2	Panorama das alterações somáticas do genoma de melanomas	8
1.1.3	Síndromes de câncer hereditário	13
1.1.4	Melanoma hereditário	17
1.1.5	Variação do número de cópias de grandes sequências de DNA (<i>copy number variations - CNV</i>) na etiologia de doenças genéticas	24
1.1.6	Sequenciamento de exoma (<i>exoma sequencing</i>).....	27
2	OBJETIVO	30
2.1	Objetivo Geral.....	30
2.2	Objetivos Específicos.....	30
3	MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1	Casuística	31
3.2	Métodos.....	32
3.2.1	Investigação de variação no número de cópias genômicas (CNVs).....	32
3.2.2	Sequenciamento de exoma.....	34
4	RESULTADOS	42
4.1	Estudo de alterações no número de cópias genômicas - CNVs	42
4.1.1	Melanoma e neoplasia pancreática intraepitelial	42
4.1.2	Melanoma familiar e melanomas múltiplos	56
5	RESULTADOS – SEQUENCIAMENTO DE EXOMA	61
6	DISCUSSÃO	89

7	CONCLUSÃO	99
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	101

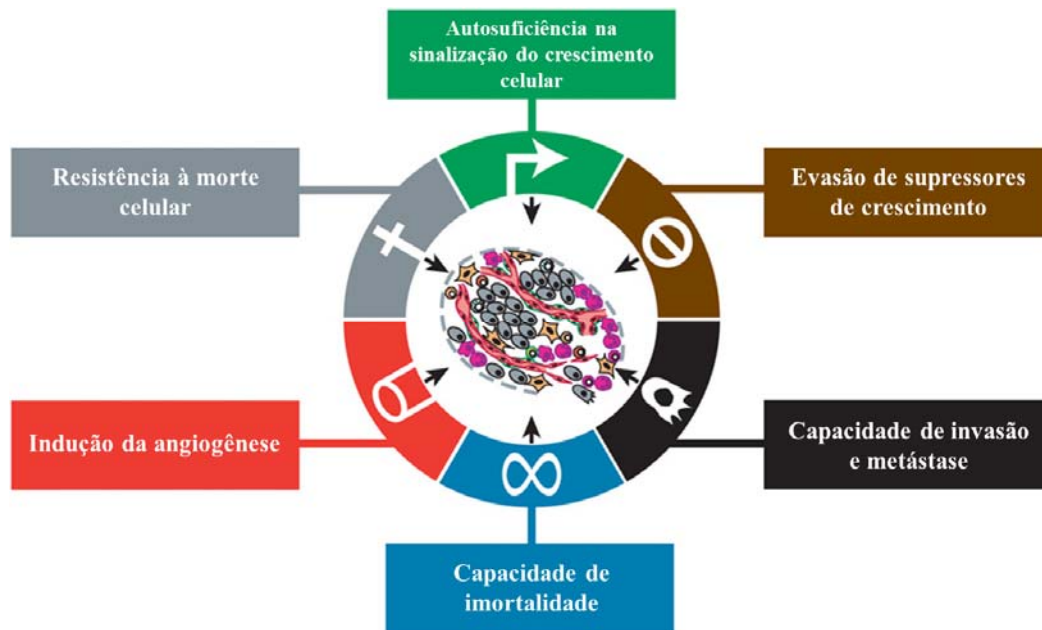
ANEXOS

- Anexo 1** Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP
- Anexo 2** Detalhes clínicos do grupo de 41 pacientes de melanoma negativos para mutações em *CDKN2A*, *CDK4*, *TERT* e *MITF*
- Anexo 3** Variantes raras germinativas identificadas por sequenciamento de exoma nos 5 pares de pacientes afetados por melanoma.

1 INTRODUÇÃO

Segundo dados da OMS, em 2012, 8,2 milhões de pessoas morreram por câncer em todo mundo. Para o ano de 2016, são estimados nos EUA cerca de 1,7 milhões de novos casos e aproximadamente 600 mil mortes causadas por câncer (SIEGEL et al. 2016).

O câncer pode ser definido como um grupo heterogêneo de doenças complexas, provocadas pelo acúmulo sequencial de mutações em células somáticas que as direciona ao estágio neoplásico por meio da alteração do funcionamento de genes de vias moleculares importantes, como controle do ciclo celular, apoptose e diferenciação. Dessa forma, a massa celular em transformação adquire progressivamente características que são essenciais para o desenvolvimento tumoral como resistência à morte celular, proliferação exacerbada, evasão de supressores de crescimento, capacidade de invasão e metástase, imortalidade e indução da angiogênese (Figura 1) (HANAHAN e WEINBERG 2011).



Fonte: Adaptado de HANAHAN E WEINBERG (2011).

Figura 1 - Características adquiridas por uma célula maligna tumoral.

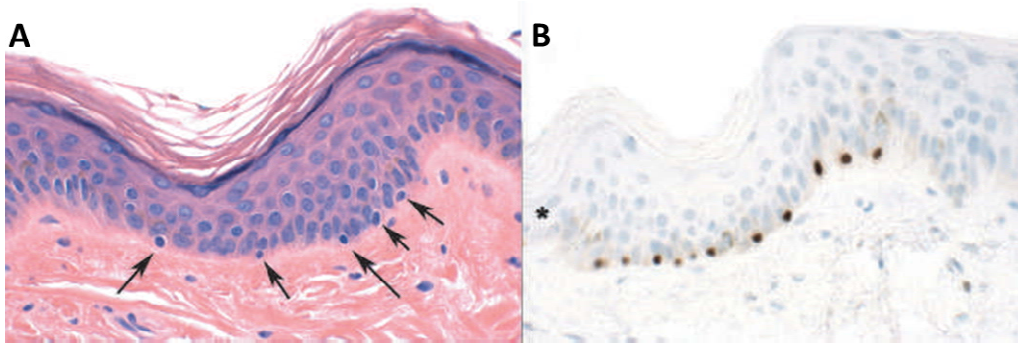
Dentre todos os casos de câncer, aproximadamente 5-10% são hereditários, ou seja, causados por mutações constitutivas ou germinativas (GARBER e OFFIT 2005). Uma síndrome de câncer hereditário se caracteriza quando um indivíduo, devido a uma mutação germinativa (herdada ou não), possui um risco aumentado de desenvolver algum tipo tumoral, mesmo em idade precoce (RAHNER e STEINKE 2008).

A identificação de genes que predisõem ao desenvolvimento de tumores, além de permitir aconselhamento genético adequado e manejo clínico dessas famílias para diagnóstico precoce de câncer, também esclarece vias moleculares que são importantes para os cânceres esporádicos correspondentes (NAGY et al. 2004).

1.1 MELANOMA CUTÂNEO

O melanoma representa cerca de 4% de todos os casos de câncer de pele. Entretanto, este tipo de câncer é responsável por aproximadamente 80% das mortes dessa doença devido à alta capacidade de metástase e refração a tratamentos quimioterápicos (MILLER e MIHM 2006). Nos EUA são estimados cerca de 76 mil novos casos de melanoma para este ano e aproximadamente 10 mil mortes devido a essa doença (SIEGEL et al. 2016). No Brasil, o INCA estima cerca de 6 mil novos casos para o ano de 2016 e no mundo, cerca de 55 mil mortes foram estimadas em decorrência do melanoma em 2015 (FERLAY et al. 2015). Embora este câncer seja muito agressivo, a sobrevida em 5 anos é muito boa quando a doença é diagnosticada nos estágios iniciais (>91%). Entretanto, em melanomas detectados mais tardiamente, como no estágio de melanoma atingindo linfonodos regionais e com focos de metástase, a sobrevida cai para 63% e 16%, respectivamente (Surveillance, Epidemiology, and End Results-SEER 2005-2011).

O melanoma tem origem a partir da transformação maligna dos melanócitos, células produtoras de melanina que ficam localizados na membrana basal da epiderme (Figura 2) (LIN e FISHER 2007). A principal função dos melanócitos é proteger a pele pela absorção da radiação ultravioleta, promovendo fotoproteção e termo-regulação da pele através da produção de melanina, que é a responsável pela pigmentação. O fenótipo da pele (cor) é o fator de suscetibilidade mais fortemente associado ao câncer de pele em humanos (LIN e FISHER 2007).

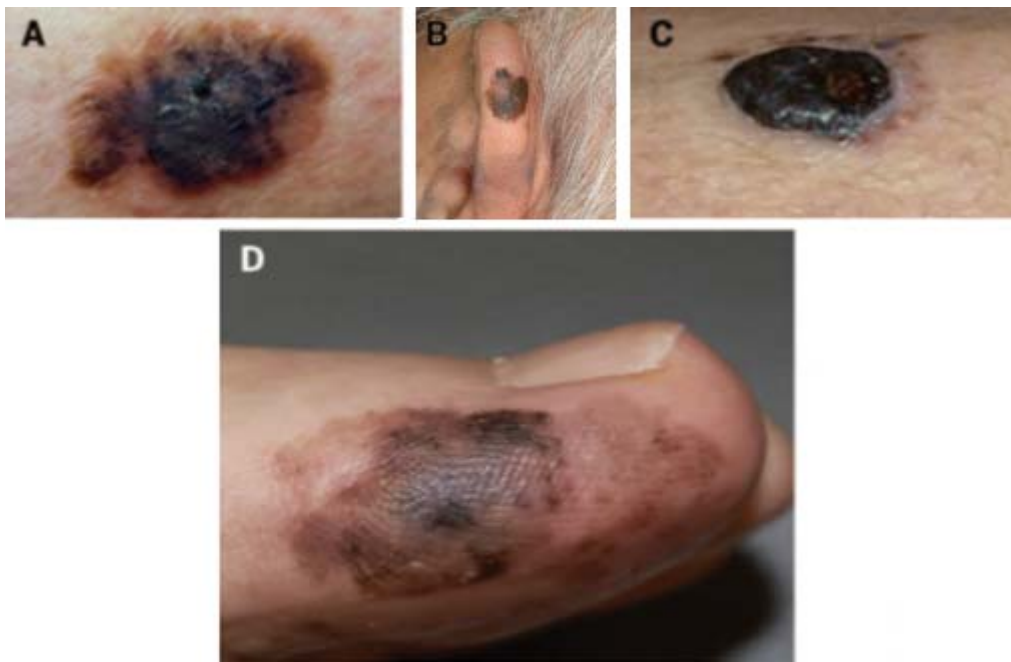


Fonte: Adaptado de LIN e FISHER (2007).

Figura 2 - Melanócitos. (A) Pele humana normal corada com Hematoxilina mostrando os melanócitos na camada basal da epiderme (setas); (B) Imunohistoquímica do mesmo tecido marcando os melanócitos usando o marcador D5 que cora o fator de transcrição MITF no núcleo dos melanócitos (marrom).

Melanomas podem ser classificados em alguns subtipos, abaixo listados quatro principais subtipos cutâneos (Figura 3) (LO e FISHER 2014):

- A. *Melanoma extensivo superficial*: é o tipo mais comum de melanoma e se caracteriza por lesões planas ou elevadas. Apresenta bordas irregulares, coloração heterogênea e crescimento vertical e radial.
- B. *Melanoma lentigo maligno*: lesão de bordas e pigmentação irregulares que possui coloração marrom e negra.
- C. *Melanoma nodular*: de característica agressiva e forma nodular, representa 15% de todos os melanomas. Esse subtipo cresce verticalmente de maneira rápida com nenhum ou pouco crescimento radial.
- D. *Melanoma lentiginoso acral*: é um subtipo raro, agressivo e de difícil detecção precoce. Desenvolvendo-se principalmente na palma das mãos e sola dos pés.



Fonte: Adaptado de LO e FISHER (2014).

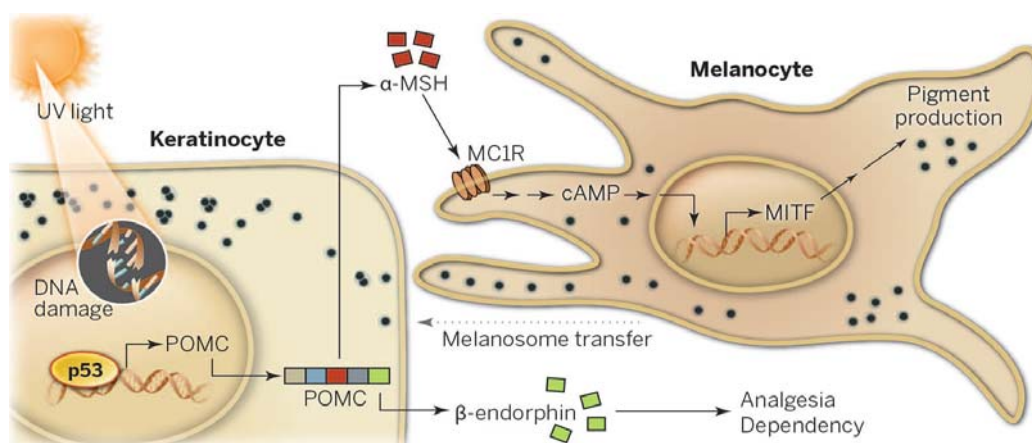
Figura 3 - Imagens dos principais subtipos de melanoma cutâneo. (A) Melanoma extensivo superficial; (B) Melanoma lentigo maligno; (C) Melanoma nodular; (D) Melanoma lentiginoso acral.

1.1.1 Fatores de risco do melanoma cutâneo

Os fatores de risco podem ser classificados em fatores de predisposição genética e fatores ambientais. Dentre todos, os principais são histórico pessoal e/ou familiar de melanoma, presença de nevos atípicos e/ou múltiplos, sensibilidade ao sol (fototipo) e padrão de exposição à radiação ultravioleta (UV) (MILLER e MIHM 2006).

A radiação UV é o fator ambiental mais conhecido e investigado no desenvolvimento do melanoma. Quando a pele é exposta à radiação UV, os queratinócitos induzem os melanócitos a produzirem melanina, que pode ser de dois tipos: eumelanina (coloração marrom ou negra) e feomelanina (coloração amarela ou vermelha), associada ao fenótipo de cabelos ruivos e sardas (GARIBYAN e FISHER 2010). Esse processo da síntese de melanina é mediado pela estabilização da proteína

supressora tumoral p53, causada pelo dano ao DNA provocado pela radiação UV. Isso leva à ativação da expressão de *POMC* (proopiomelanocortina) que, quando clivada, gera o hormônio estimulador de melanócitos (*MSH* – *melanocyte-stimulating hormone*), que será secretado pelos queratinócitos (CUI et al. 2007). O hormônio MSH secretado pelos queratinócitos se liga ao receptor *MC1R* (*melanocortin 1 receptor*) localizado na membrana de melanócitos que, uma vez ativado, aumenta o nível de cAMP (AMP cíclico) intracelular, o que leva à transcrição do fator de transcrição *MITF* (*microphthalmia-associated transcription factor*), ativando uma cascata de sinalização que induz o bloqueio do ciclo celular e aumenta a produção de melanina (Figura 4) (GILES et al. 2012).



Fonte: adaptado de LO e FISHER (2014).

Figura 4 - Resposta ao dano ao DNA causado pela radiação UV e síntese de melanina.

A melanina produzida nos melanócitos é então empacotada e transportada até os queratinócitos pelos melanossomos (MARKS e SEABRA 2001). A função da melanina pode ser distinta de acordo com o subtipo da mesma. A eumelanina tem

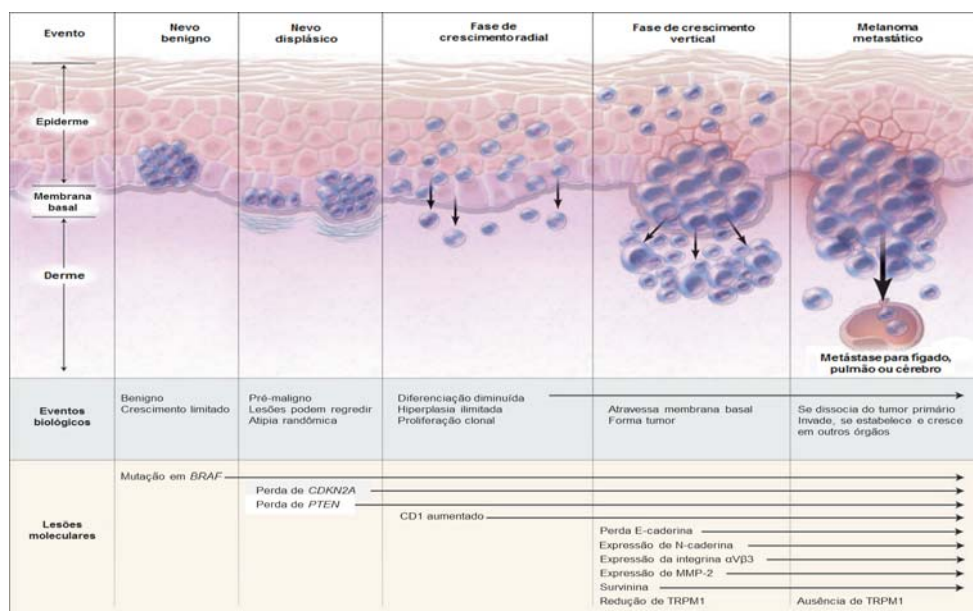
capacidade de absorver a radiação UV prejudicial e liberá-la em forma de calor, prevenindo assim o dano causado pela radiação ao DNA genômico. A feomelanina não possui essa capacidade e ainda pode contribuir para a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), contribuindo por outra via, indireta, para causar danos ao DNA em resposta à radiação UV (GARIBYAN e FISHER 2010).

Indivíduos que possuem o fenótipo de cabelos ruivos, pele clara, que apresentam sardas e incapacidade de bronzeamento tem risco aumentado de desenvolver melanoma e isso se deve a uma capacidade menor de fotoproteção à radiação UV (REES 2003; LO e FISHER 2014). Entretanto, um estudo recente observou que a suscetibilidade aumentada desses indivíduos em desenvolver melanoma se deve principalmente aos efeitos carcinogênicos intrínsecos da feomelanina, via espécies reativas de oxigênio (MITRA et al. 2012; LO e FISHER 2014).

Indivíduos com histórico de câncer também apresentam risco mais elevado para desenvolver melanoma do que o da população em geral (AZOURY e LANGE 2014). No caso do indivíduo já ter tido um melanoma ou outro câncer de pele, o risco relativo desse indivíduo desenvolver um novo melanoma primário é aproximadamente 3x maior do que a população geral (RHODES et al. 1987). Histórico de câncer neural, de mama e próstata também aumentam o risco para o desenvolvimento de melanoma ao longo da vida (TUCKER et al. 1985; LEVI et al. 2003; LI et al. 2013).

1.1.2 Panorama das alterações somáticas do genoma de melanomas

O modelo de Clark foi um dos primeiros a descrever a progressão de melanócitos normais para melanomas (CLARK et al. 1984). Entretanto, é sabido que melanomas raramente se desenvolvem a partir de nevos melanocíticos benignos (BEVONA et al. 2003; TSAO et al. 2003). Sendo assim, a maioria dos melanomas cutâneos provavelmente originam-se por vias alternativas ao modelo de Clark, como proposto por outros estudos mais recentes que sugerem que melanomas podem se desenvolver a partir de células tronco precursoras (RASHEED et al. 2005). No entanto, o modelo de Clark é ainda utilizado de forma ilustrativa para as diferentes etapas da progressão do melanoma e estudos já correlacionaram alterações genéticas a estas etapas propostas, conforme mostrado na Figura 5 (correlação das diferentes fases da progressão de acordo com a característica histológica e eventos genéticos envolvidos).



Fonte: Adaptado de MILLER e MIHM (2006).

Figura 5 - Modelo de Clark. Progressão de melanócitos normais para melanoma e correlação com alterações genéticas em cada etapa.

Durante a oncogênese, inúmeras mutações somáticas ocorrem, mas apenas algumas delas são consideradas direcionadoras do fenótipo tumoral ou *driver mutations*. Os desafios na identificação de tais mutações “*driver*”, que afetariam genes de fato relevantes para a melanomagênese, são vários, incluindo o grau de heterogeneidade que esses tumores apresentam e a alta taxa de mutações somáticas (LO e FISHER 2014). Os melanomas apresentam alta taxa de mutações em decorrência dos efeitos mutagênicos da radiação UV, que provoca em citosinas uma desaminação hidrolítica, resultando em troca de citosinas por timinas (PLEASANCE et al. 2010). Esse tipo de assinatura mutacional C→T é encontrado em aproximadamente 50% dos melanomas, tornando-se determinante quando acomete genes supressores tumorais, tais como *CDKN2A*, *PTEN* e *TP53* (HODIS et al. 2012).

Via MAPK (*mitogen-activated protein kinase*)

A alteração da via MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) é um dos eventos mais bem caracterizados em melanomas e resulta no estímulo de crescimento das células (MILLER e MIHM 2006).

Dentre o panorama de mutações mais frequentes que ativam a via da MAPK, o gene *BRAF* é um dos mais bem caracterizados e possui grande importância clínica por ser um alvo terapêutico (Vemurafenib) (Pb 2011). O gene *BRAF* encontra-se mutado em aproximadamente 70% dos melanomas, aproximadamente 90% dos casos afetando um único códon (V600E), o que acarreta na troca de uma Valina por um Glutamato (DAVIES et al. 2002; BESARATINIA e PFEIFER 2008). Entretanto, mutações em *BRAF* também já foram identificadas em nevos benignos na mesma frequência que em melanomas metastáticos (aproximadamente 80%), o que sugere

que essa mutação é insuficiente para a melanomagênese (POLLOCK et al. 2003). Em modelo desenvolvido em *zebrafish*, a expressão de *BRAF* mutado só induz a malignidade dos melanócitos quando aliado à inativação do gene *TP53* (PATTON et al. 2005). Embora tenha função central na biologia dos melanomas, o gene *BRAF* parece não ser um gene de predisposição a essa doença; notavelmente, indivíduos portadores de mutação germinativa neste gene tem a síndrome congênita cardiofaciocutânea, que não aumenta a predisposição a melanoma (JACKSON et al. 2005; NIIHORI et al. 2006).

O gene *NRAS* também atua ativando a via MAPK e encontra-se mutado em aproximadamente 15% dos melanomas (MILLER e MIHM 2006).

A importância de mutações ativadoras de *BRAF* e *NRAS* é clara, visto que vários estudos observaram que o silenciamento desses genes leva à supressão do crescimento de células de melanoma *in vitro* (HINGORANI et al. 2003; ESKANDARPOUR et al. 2005; HOEFLICH et al. 2006).

Via PI3K (*Phosphatidylinositol 3-kinase*)

PI3K é uma família de quinases lipídicas que fosforilam o grupo 3-hidróxi das moléculas de fosfatidilinositol presentes na membrana celular (GUO et al. 2015). A via de PI3K é composta por diversos genes que atuam basicamente na inibição da apoptose, no crescimento e proliferação celulares, encontrando-se frequentemente alterada em pacientes com diversos tipos tumorais (FRESNO VARA et al. 2004).

Nessa via, o principal gene com mutação encontrada em melanomas é *AKT3* (*V-Akt Murine Thymoma Viral Oncogene Homolog 3*), um membro da família de proteínas de AKT. O gene *AKT3* encontra-se amplificado em 40-60% dos

melanomas e está ativo de maneira constitutiva em aproximadamente 50% dos melanomas primários e 70% de melanomas metastáticos; quando silenciado, reduz a formação de tumores *in vivo* (STAHL et al. 2004; JI et al. 2010; BIS e TSAO 2013).

Nesta mesma via encontra-se outro gene importante para melanoma, *PTEN*, que codifica uma proteína supressora tumoral que regula negativamente a via da PI3K. Mutações de ponto são eventos raramente observados afetando *PTEN* (~10%) (HODIS et al. 2012; VAN DEN HURK et al. 2012); por outro lado, deleções afetam esse gene em uma frequência de aproximadamente 30% (HODIS et al. 2012; BIS e TSAO 2013). Portanto, mutações que ocasionam a perda de função de *PTEN* aumentam a ativação da via de AKT e, conseqüentemente, crescimento celular e ausência de apoptose (KO et al. 2010).

CDKN2A (Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A)

Além de ser o principal gene de predisposição a melanoma, encontrando-se mutado de maneira germinativa em até 40% das famílias da síndrome do melanoma hereditário, exibe alta frequência de deleção e/ou inativação por metilação durante a progressão de melanomas esporádicos: ~20% em melanomas primários e ~40% em melanomas metastáticos (SINI et al. 2008; BIS e TSAO 2013). Embora mais baixa, mutações de ponto neste gene são também observadas em aproximadamente 20% dos melanomas esporádicos (HODIS et al. 2012). Esses dados reforçam a importância de *CDKN2A* na manutenção do controle do ciclo celular e também na tumorigênese do melanoma cutâneo.

Outros genes

Diversos outros genes têm sido relacionados com o processo de formação e progressão de melanomas. Um estudo recente avaliou amostras sem mutações em *BRAF* e *NRAS* a fim de encontrar outras mutações “*drivers*” em melanomas e mutações no gene *NF1* (*neurofibromin 1*) foram detectadas com frequência significativa (25%), sugerindo que a inativação causada por essa mutação pode conferir a ativação exacerbada da via MAPK, visto que *NF1* é um regulador negativo da via de sinalização RAS (HODIS et al. 2012). Além de genes clássicos de melanoma (*BRAF*, *NRAS*, *PTEN*, *TP53*, *CDKN2A* (p16) e *MAP2K1*), este mesmo estudo (HODIS et al. 2012) identificou 5 novos genes candidatos, apresentando mutações *drivers* (funcionalmente relevantes e estatisticamente significantes): *PPP6C*, *RAC1*, *SNX31*, *TACCC1* e *STK19*.

Ainda em 2012, outro estudo identificou o gene *PREX2* como frequentemente mutado em melanomas, com atividade oncogênica, acarretando pior sobrevida a camundongos inoculados com células de melanoma contendo esse gene mutado (BERGER et al. 2012).

Os genes *GNAQ* (*Guanine Nucleotide Binding Protein (G Protein), Q Polypeptide*) e *KIT* (*V-Kit Hardy-Zuckerman 4 Feline Sarcoma Viral Oncogene Homolog*) também já foram associados a melanomas, porém estão associados preferencialmente a melanomas oculares e de mucosas, respectivamente. Mutações no gene *GNAQ* parecem ocorrer exclusivamente no códon 209, ocasionando a ativação constitutiva de vias de sinalização de membros da proteína quinase C, que podem ativar a via das MAPK (VAN RAAMSDONK et al. 2009), o que poderia explicar a ativação da via de MAPK na ausência de mutações em *BRAF* ou *NRAS*

(KO et al. 2010). O gene *KIT* encontra-se mutado mais frequentemente em melanomas de mucosas, afetando principalmente os exons 11 e 13. As mutações de *KIT* são ativadoras, originando transdução de sinais para ativar vias como MEK/ERK, PI3K/AKT e JAK/STAT (KIM e ALRWAS 2014). Mutações ativadoras em *KIT* são alvo de terapias utilizando, por exemplo, o fármaco Imatinib, um inibidor de diversos tipos de tirosinaquinases, dentre elas *KIT*, que apresenta resposta clínica de aproximadamente 35% em pacientes com melanomas avançados com mutações em *KIT* nos exons 11 ou 13 (KIM e ALRWAS 2014).

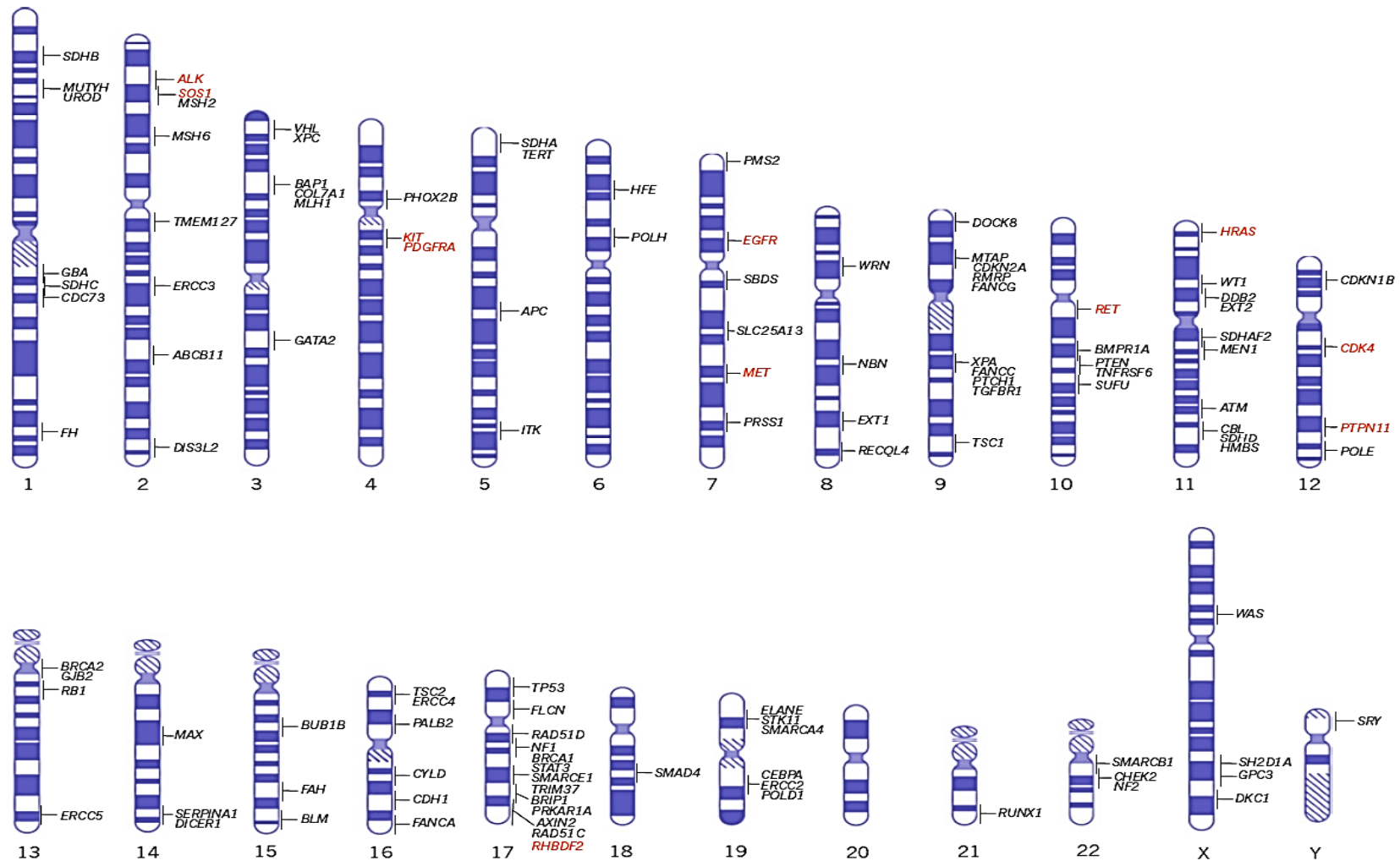
1.1.3 Síndromes de câncer hereditário

O câncer hereditário representa cerca de 5-10% de todos os casos de câncer (GARBER e OFFIT 2005). Uma síndrome de câncer hereditário é caracterizada pela existência de uma mutação germinativa ou constitutiva no genoma de um indivíduo, que confere risco aumentado de desenvolver um tipo tumoral específico ao longo da vida (RAHNER e STEINKE 2008). Embora relativamente raros, os casos de câncer hereditário ou de alta predisposição genética possuem grande importância, pois esses pacientes e suas famílias necessitam de acompanhamento e cuidados especiais (RAHNER e STEINKE 2008).

A descoberta de genes que predispõem a um risco maior ao desenvolvimento de tumores, além de permitir um aconselhamento genético e um gerenciamento dessas famílias de maneira mais adequada para um diagnóstico precoce dos tumores, também esclarece vias moleculares que são importantes para tumores esporádicos (NAGY et al. 2004). Algumas características são utilizadas na prática clínica para identificar famílias com síndrome do câncer hereditário, como: dois ou mais parentes

com o mesmo tipo de câncer no mesmo lado da família; diversas gerações afetadas; tumores em idade precoce daquelas tipicamente observadas para aquele tipo de câncer; indivíduos com múltiplos tumores primários; ocorrência de tumores geneticamente relacionados em uma família (câncer de mama e ovário, por exemplo); ocorrência de condições não malignas e câncer no mesmo indivíduo e/ou família. Entretanto, nem todas as famílias preenchem esses critérios, devido a fatores como expressividade variável (variabilidade fenotípica), penetrância associada à idade do indivíduo e dependente ou modulada pelo gênero (NAGY et al. 2004).

Atualmente mais de 100 genes com mutações germinativas altamente penetrantes já foram relacionados à predisposição a câncer (Figura 6) (RAHMAN 2014). O mapeamento de tais genes se iniciou há mais de 30 anos, porém, mais recentemente, com o advento da técnica de *Next Generation Sequencing* (NGS), novos genes de predisposição a câncer (GPC) começaram a ser identificados com maior eficácia (WHITCOMB et al. 1996; ZUO et al. 1996; RAHMAN et al. 2007; SMITH et al. 2013).



Fonte: Adaptado de RAHMAN (2014).

Figura 6 - Genes de predisposição a câncer. Esta figura mostra os 24 tipos de cromossomos do genoma humano e a localização nos mesmos de genes de predisposição a câncer; a grande maioria é composta por genes supressores de tumor (símbolos em preto), com poucos oncogenes descritos (em vermelho)

A maioria dos GPC são supressores tumorais que sofrem mutações de perda de função, tornando-se ineficientes no controle do ciclo celular, ou reparo de DNA/manutenção do genoma, o que desencadeia a oncogênese ou propicia um maior número de mutações. O padrão funcional de diferentes mutações em um mesmo gene pode causar fenótipos diferentes, além de poder ser modulado também por fatores como *background* genético e/ou fatores ambientais (BERGER et al. 2011; HUFF 2011; RAHMAN 2014). O padrão de manifestação desses genes pode ser autossômico dominante, autossômico recessivo, ligado ao X e ao Y (RAHMAN 2014). Além disso, portadores de mutações bi-alélicas em genes com padrão de manifestação dominantes, como *BRCA2*, *PALB2*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* e *PMS2*, possuem risco maior de desenvolver câncer na infância, enquanto que portadores de mutações nesses genes em apenas um alelo possuem maior risco de desenvolver câncer quando adultos, ao longo da vida (RAHMAN e SCOTT 2007).

Embora a maioria dos genes de predisposição atue em vias de sinalização sempre relacionadas com funções como reparo de dado ao DNA, apoptose e regulação do ciclo celular, mutações em diferentes genes levam ao desenvolvimento de tumores específicos. Como exemplo, o gene *BRCA1* está fortemente associado ao desenvolvimento de tumores de mama do tipo triplo-negativo e câncer de ovário (MAVADDAT et al. 2012; RAHMAN 2014). Outro exemplo é que indivíduos com mutação no gene *CDKN2A* possuem maior predisposição a desenvolver melanomas e carcinomas de pâncreas (RUSTGI 2014). Recentemente, mutações no promotor do gene *TERT* também foram associadas ao fenótipo específico de desenvolvimento de melanomas (RAHMAN 2014). Entretanto, a base desse fenômeno de especificidade

fenotípica das mutações dos genes de predisposição a câncer ainda não é totalmente compreendida.

1.1.4 Melanoma hereditário

Segundo o *American College of Medical Genetics and Genomics and the National Society of Genetic Counselors*, os critérios para o diagnóstico clínico de síndrome de melanoma familiar incluem (HAMPEL et al. 2015): casos de melanoma e/ou câncer pancreático em parentes próximos; 3 melanomas primários no mesmo indivíduo; melanoma e câncer pancreático no mesmo indivíduo; melanoma e astrocitoma no mesmo indivíduo ou em 2 parentes de primeiro grau.

A arquitetura genética que compõe o risco de desenvolvimento de melanoma é complexa e não compreendida em sua totalidade (WARD et al. 2012), sendo composta por variantes dentro de um espectro de risco amplo, de alto a moderado/baixo. Estudos mostram que até 13% de todos os casos de melanoma são reportados em indivíduos que possuem pelo menos um parente de primeiro grau que também já foi acometido por melanoma; parentes de primeiro grau de indivíduos acometidos por melanoma possuem um risco 6-7% maior de desenvolver melanoma até os 80 anos (FORD et al. 1995; BEGG et al. 2004).

Aproximadamente 10% dos casos de melanoma são causados por mutações germinativas (HANSEN et al. 2004) de alta penetrância, como *CDKN2A*, por exemplo. Embora novos genes tenham sido recentemente identificados como fatores de predisposição ao melanoma, esses casos respondem por uma parcela muito pequena dentre todos os casos que possuem componente hereditário. Portanto, a maioria dos casos de melanoma cutâneo permanece com etiologia desconhecida,

impedindo o aconselhamento genético adequado dos pacientes propensos a melanoma e suas famílias.

Genes de alta penetrância

- *CDKN2A*

Foi o primeiro gene identificado associado ao melanoma familiar (HUSSUSSIAN et al. 1994; KAMB et al. 1994). Dentre todos os casos de melanoma hereditário, cerca de 20-40% são causados por mutações de alta penetrância, que afetam principalmente a isoforma p16 codificada pelo gene *CDKN2A*. Esse gene está localizado em 9p21.3, possui função de supressor tumoral, atuando principalmente no controle do ciclo celular entre as fases G1 e G2 e também auxilia na indução da apoptose, impedindo a degradação de p53 pelo bloqueio do oncogene *MDM2* (*MDM2 Proto-Oncogene, E3 Ubiquitin Protein Ligase*) (GENECARDS 2015).

Alguns estudos mostram que indivíduos portadores de mutações germinativas em *CDKN2A* desenvolvem melanomas mais precocemente (média de 42 anos ao diagnóstico) em relação a pacientes sem mutação (média de 61 anos) (MÅSBÄCK et al. 2002). Em outro estudo, a idade média de indivíduos portadores de mutação em *CDKN2A* foi de 33 anos, em comparação a indivíduos sem mutação, mas com histórico de melanoma na família (média de 41 anos) e indivíduos da população geral (média de 53 anos) (FITZGERALD et al. 1996). No Brasil, um estudo recente de nosso grupo realizado no AC Camargo Cancer Center com 59 pacientes com critérios clínicos para síndrome do melanoma familiar e/ou com melanomas primários múltiplos identificou mutações no gene *CDKN2A* em 14% dos probandos (DE ÁVILA et al. 2014).

A penetrância da mutação germinativa, ou seja, a manifestação do fenótipo (melanoma), é estimada em 58-92% até os 80 anos (PARKER et al. 2003). É importante ressaltar que a penetrância de *CDKN2A* é muito variável de acordo com a população avaliada e é modulada por outros fatores genéticos e ambientais (BISHOP et al. 2002).

- *CDK4*

Mutações germinativas no gene *CDK4* (*Cyclin-Dependent Kinase 4*) foram identificadas pela primeira vez em 1996 e são consideradas de alta penetrância no desenvolvimento de melanoma (ZUO et al. 1996). Entretanto, são raríssimos os casos de melanoma hereditário em decorrência de mutações constitutivas nesse gene (GOLDSTEIN et al. 2006; HANSSON 2010).

Todos os casos já descritos associados a mutações em *CDK4* afetam o códon 24 desse gene. Nessa posição, o resíduo de arginina é crucial para que p16 se ligue à proteína CDK4 e inative-a, porém as mutações atrapalham essa ligação (AOUDE et al. 2015). Em estudo anterior de nosso grupo, rastreamos mutação pontual neste códon nos 59 pacientes e nenhuma mutação foi detectada (DE ÁVILA et al. 2014).

- *BAP1*

O gene *BAP1* (*BRCA1-associated protein-1/ubiquitin carboxy-terminal hydrolase*) é um supressor tumoral que codifica uma enzima envolvida na remoção de ubiquitina de proteínas, principalmente à proteína codificada pelo gene *BRCA1*. Em 2011, um estudo identificou duas famílias não relacionadas portadoras de mutações inativadoras de alta penetrância no gene *BAP1*, com fenótipo de predisposição ao desenvolvimento de melanoma cutâneo e uveal (WIESNER et al.

2011). Além disso, 50% dos tumores de uma dessas famílias sofreram perdas na região 3p21, incluindo o gene *BAP1*, sugerindo um segundo evento que eliminou o único alelo selvagem que os indivíduos portavam.

Em outro estudo verificou-se que esse gene foi associado ao fenótipo metastático de melanomas uveais esporádicos, com mutações somáticas de perda de função em 84% dos casos (HARBOUR et al. 2010).

- *POT1*

Esse gene possui uma função essencial na manutenção e integridade do telômero, sendo um dos componentes do complexo telomérico *shelterin* que se liga a repetições de DNA, impedindo a exposição do fim da molécula de DNA do cromossomo e prevenindo o processo inapropriado de resposta de dano ao DNA (LOAYZA e DE LANGE 2003; PALM e DE LANGE 2008). Dois estudos recentes identificaram variantes no gene *POT1* (*Protection of telomeres 1*) como sendo de alta penetrância em famílias de diferentes populações, com maior predisposição a melanoma. Indivíduos dessas famílias apresentavam melanomas em idade precoce e múltiplos melanomas primários. Além disso, variantes identificadas afetando *POT1* foram descritas como alterações em sítio de *splicing* ou alterações em resíduos importantes e altamente conservados, o que compromete o pareamento de POT1 com os telômeros, levando a aumento do tamanho dessas regiões cromossômicas em decorrência da perda da função desse gene (ROBLES-ESPINOZA et al. 2014; SHI et al. 2014).

- *TERT*

Esse gene codifica uma subunidade proteica da enzima telomerase, que atua na manutenção do comprimento dos telômeros. A mutação no gene *TERT* (*Telomerase Reverse Transcriptase*) associada à suscetibilidade ao melanoma cutâneo foi identificada na região promotora desse gene, a 57bp do sítio de início de transcrição ATG do mesmo, criando um sítio de ligação de fatores de transcrição que aumenta sua atividade (HORN et al. 2013). Além disso, mutações nesse gene parecem predispor a uma gama de outros tipos de tumores que não melanoma, como por exemplo, câncer de ovário, de células renais e mama (HORN et al. 2013).

Em 2014 um trabalho de nosso grupo avaliou a presença da mutação no gene *TERT* (c.T-57G) em uma coorte de 48 pacientes sem mutação em *CDKN2A* e *CDK4*, sem detecção de nenhum portador (PRAMIO et al. 2014).

- *ACD e TERF2IP*

Mais recentemente, um estudo utilizou técnicas de sequenciamento de nova geração para avaliar 510 famílias quanto a mutações germinativas em cinco genes do complexo de “shelterinas” (*ACD*, *TERF2IP*, *TERF1*, *TERF2* e *TINF2*), identificando novas variantes genômicas de alto risco afetando os genes *ACD* e *TERF2IP* em famílias de predisposição a melanoma (AOUDE et al. 2015). Mutações do tipo *missense* e *nonsense* foram encontradas nos dois genes, levando à ausência de formação ou formação inadequada do complexo de shelterinas. No caso de *ACD*, a mutação nonsense (p.Q320X) ocorre em um sítio de ligação com o gene *POT1*. Já em *TERF2IP*, a mutação nonsense (p.R364X) resulta no truncamento da região C-terminal da proteína e compromete o domínio de ligação a *TERF2* (AOUDE et al. 2015).

*Genes de penetrância moderada**- MITF*

Recentemente, *MITF* (*Microphthalmia-Associated Transcription Factor*) foi descrito como sendo um gene de penetrância moderada na predisposição ao melanoma. Foi identificada uma variante afetando o códon E318K (c.G1075A) em famílias do Reino Unido e Austrália, sendo principalmente associada a famílias com histórico de melanoma e múltiplos melanomas primários e também com maior número de nevos e olhos escuros (YOKOYAMA et al. 2011). O efeito dessa variante foi similar àquelas observadas em indivíduos com cabelo ruivo com variantes no gene *MC1R* (WILLIAMS et al. 2011; YOKOYAMA et al. 2011). A alteração em *MITF* (E318K) ocorre em uma região de modificação pós-traducional da proteína codificada, na qual ocorreria a ligação de fatores de sumoilação, fazendo com que a proteína se mantenha ativa. Além disso, regula a atividade transcricional de *MITF* e aumenta a expressão de outros genes envolvidos na pigmentação (YOKOYAMA et al. 2011).

Também avaliamos em nosso grupo de pacientes brasileiros afetados por melanoma familiar a presença da variante E318K no gene *MITF*; identificamos um paciente portador dessa mutação no grupo de 48 testados. Esse paciente desenvolveu múltiplos melanomas primários, característica clínica em consonância com a literatura sobre mutação germinativa no gene *MITF* (YOKOYAMA et al. 2011; PRAMIO et al. 2014).

- *MC1R*

Como citado anteriormente, um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de melanoma é a falta de capacidade de proteção contra a radiação UV devido à falta de eumelanina. A ativação do gene *MC1R* aumenta a proporção de eumelanina comparada à feomelanina; variantes nesse gene acarretam aumento da sensibilidade ao sol devido à diminuição na síntese dessa molécula. Assim, a grande maioria das pessoas com cabelos ruivos ou pele clara com dificuldade em bronzear são portadores de variantes nesse gene comparados a indivíduos com cabelos negros ou castanhos (VALVERDE et al. 1995; MARZUKA-ALCALÁ et al. 2014). Outras variantes no gene *MC1R* têm sido associadas a fenótipo apenas de melanoma (p.I155T e p.R163Q), enquanto algumas associam-se com fenótipos de cabelos ruivos e também melanoma. Isso sugere que existem vias relacionadas ou não a pigmentação que aumentam o risco de melanoma devido a variantes no gene *MC1R* (KENNEDY et al. 2001; RAIMONDI et al. 2008).

Variantes genômicas de baixo risco

Diversos estudos de associação GWAS (*Genome-wide association studies*) têm identificado novos *loci* de suscetibilidade ao melanoma, que incluem SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) mapeados nos genes *ATM*, *MX2*, *CASP8*, *MTAP*, *PLA2G6* e *TYR* (BISHOP et al. 2009; FALCHI et al. 2009; BARRETT et al. 2011).

Recentemente, uma meta-análise de estudos GWAS identificou novos loci de suscetibilidade a melanoma afetando os genes *RMDN2* (rs6750047), *CDKALI* (rs6914598 e rs7776158), *AGR3* (rs1636744); variante rs10739221, que fica em uma região intergênica próxima a *TMEM38B*, *RAD23B* e *TAL2*, e também uma variante

nos genes *CCND1* (rs498136) e *OCA2* (rs4778138) (LAW et al. 2015). Nesse mesmo estudo, uma variante no gene *OBFC1* (rs2995264) já havia sido descrita como associada a tamanho telomérico e com melanoma, além de ser um gene que pertence ao complexo de manutenção dos telômeros (MIYAKE et al. 2009; CODD et al. 2013; ILES et al. 2014; LAW et al. 2015).

1.1.5 Variação do número de cópias de grandes sequências de DNA (*copy number variations* - *CNV*) na etiologia de doenças genéticas

A análise citogenética é uma abordagem introduzida nos estudos genéticos há vários anos, que permanece até os dias atuais como uma técnica muito relevante na elucidação da etiologia de doenças. Há cerca de 10 anos, a técnica de hibridação comparativa de genomas baseada em *microarrays* (*array-CGH*) foi desenvolvida, permitindo investigar deleções e duplicações de segmentos genômicos submicroscópicos em milhares de sequências-alvo simultaneamente. Essa técnica aumentou extraordinariamente a resolução e a capacidade de investigação da citogenética (LEE et al. 2008), permitindo a identificação de variações no número de cópias de grandes segmentos de DNA, presentes no genoma humano de maneira constitutiva.

Os *microarrays* genômicos podem conter sequências-alvo interrogando *SNPs* (FRIEDMAN et al. 2006; SLATER et al. 2006), ou sequências-alvo genômicas aleatórias, sem DNA repetitivo, para hibridação comparativa (*array-CGH*), estas últimas aumentando a especificidade e robustez da hibridação. Mais recentemente, grande parte das plataformas comerciais oferecem microarranjos contendo estes dois tipos de sondas, em proporções variáveis. A vantagem da inclusão de *SNPs* é a

possibilidade de determinação da origem parental dos rearranjos genômicos (quando se analisa trios mãe-pai-probando) e também a detecção de segmentos com perda de heterozigose (LOH) ou dissomia uniparental (UPD), não associadas à alteração no número de cópias da região (*copy-neutral*).

Ganhos e perdas de segmentos de DNA submicroscópicos >1Kb são conhecidos como variação de número de cópias genômicas (*copy number variations* - *CNVs*) e fazem parte do *background* genético da população normal (Iafrate et al. 2004; SEBAT et al. 2004; REDON et al. 2006). As *CNVs* podem modular o fenótipo humano e assim contribuir para a singularidade de cada indivíduo (ESCARAMÍS et al. 2015); as variantes de número de cópias mais frequentes afetam um subgrupo de genes principalmente envolvidos na imunidade, interação com o ambiente e retrovírus (LI e OLIVIER 2013).

As *CNVs* ocorrem em uma gama de frequências nas diferentes populações. Além das *CNVs* frequentes, existem *CNVs* consideradas raras e parte delas está associada ao desenvolvimento de inúmeras patologias, incluindo deficiência mental e anomalias congênitas (KREPISCHI-SANTOS et al. 2006; SHAW-SMITH et al. 2006), além de suscetibilidade a câncer (SILVA et al. 2012; KREPISCHI et al. 2012a; YANG et al. 2012). Alterações genômicas causadas por *CNVs* são adequadas para o estudo de correlação genótipo-fenótipo devido à possibilidade de se detectar os mesmos genes deletados ou duplicados em indivíduos não relacionados (WATSON et al. 2014).

Existem aproximadamente 100 genes conhecidos relacionados à predisposição a câncer nas síndromes de câncer mendelianas (CAZIER e TOMLINSON 2010). Uma revisão recente indicou que >30% destes genes também

já foram observados como *CNVs* deletérias em pacientes afetados por câncer (KUIPER et al. 2010). Em famílias com síndromes de câncer clássicas e ausência de mutação de ponto nos genes candidatos, uma proporção variável apresenta deleção total ou parcial desses genes, como *BRCA1*, *BRCA2*, *hMLH1*, *hMSH2*, *APC*, e *PTCH1* (KREPISCHI et al. 2012c). Como exemplo, identificamos em uma paciente brasileira com diagnóstico clínico compatível com a síndrome de Li-fraumeni-like uma microdeleção englobando os exons 9-19 do gene *BRCA1* (SILVA et al. 2012). Em outro estudo de nosso grupo, identificamos em uma paciente diagnosticada com neurofibromatose uma microdeleção *de novo* em 17q11.2, englobando 13 genes, dentre eles o gene *NF1* (KREPISCHI et al. 2012b). Uma vez que deleções ou duplicações de exons ou genes inteiros podem não ser detectados no sequenciamento convencional, técnicas que quantificam número de cópias, como amplificação multiplex de sondas dependente de ligação (MLPA) e *real-time PCR* quantitativo foram também adicionadas à rotina clínica de diagnóstico, mais recentemente.

Algumas *CNVs* raras podem agir como mutações de alta penetrância, como no caso de doenças congênitas como a deficiência mental. As *CNVs* mais facilmente identificáveis geralmente apresentam um padrão mendeliano dominante de manifestação e sinalizam a localização cromossômica de genes associados de maneira causal a doenças, por mudança de dose decorrente de número de cópias (*dosage-sensitive genes*) ou outros mecanismos (VISSERS et al. 2004; LESNIK-OBERSTEIN et al. 2006). Muitas *CNVs* já foram associadas a doenças complexas, e trabalhos recentes mostram a existência de forte associação causal entre *CNVs* raras específicas (como discutido acima) e suscetibilidade a câncer (KUIPER et al. 2010; SHLIEN e MALKIN 2010). Embora a contribuição de *CNVs* como fator de

predisposição ao câncer não seja ainda totalmente mensurada, o mecanismo mais provável é a deleção de genes supressores tumorais, embora duplicações de proto-oncogenes ou alterações na estrutura gênica também poderiam levar à modificação de função.

1.1.6 Sequenciamento de exoma (*exome sequencing*)

O sequenciamento de nova geração (*next generation sequencing* – NGS) é uma ferramenta poderosa que vem revolucionando a genética e permite a investigação de painéis gênicos, exoma ou genoma completo. Por suas características técnicas e crescente redução de custo, as técnicas NGS substituirão, em grande medida, o sequenciamento direto de genes, assim como os *arrays* genômicos, para identificação de variantes genômicas do tipo SNPs, indels e CNVs.

A NGS vem sendo empregada nos últimos anos no estudo do genoma de tumores diversos, visando identificar mutações recorrentes importantes no processo carcinogênico. Uma alternativa ao sequenciamento do genoma completo é a busca por mutações patogênicas apenas nas sequências codificadoras do genoma humano (sequenciamento de exoma). Esse tipo de abordagem é bastante robusta e gera grande quantidade de dados em pouco tempo, fornecendo alta cobertura de sequências codificadoras, com custo e complexidade menores quando comparados ao sequenciamento do genoma total.

Em melanomas, trabalhos recentes utilizando NGS identificaram novos genes atuando diretamente na biologia desse tumor. Pelo sequenciamento do genoma de 25 melanomas metastáticos, (BERGER et al. 2012) identificaram mutações recorrentes no gene *PREX2*, dado validado pela frequência de detecção encontrada de alterações

neste gene (14%) na investigação por sequenciamento capilar bidirecional de corte adicional de 107 melanomas; a importância de *PREX2* na tumorigênese fora previamente evidenciada em tumores de cólon, pulmão e pancreático (FORBES et al. 2010; BERGER et al. 2012). Em outro estudo realizado por sequenciamento de exoma, foram identificadas mutações somáticas recorrentes nos genes *MAP2K1* e *MAP2K2* em sete linhagens de células de melanomas; a investigação por sequenciamento Sanger em um grupo de validação biológica de 127 melanomas confirmou a relevância destes genes, com taxa de mutação em *MAP2K1* ou *MAP2K2* de 8% (NIKOLAEV et al. 2012).

No caso de mutações germinativas e melanoma familiar, o gene *MITF* (*microphthalmia-associated transcription factor*) foi identificado recentemente como candidato à predisposição hereditária (YOKOYAMA et al. 2011). O genoma inteiro foi sequenciado em um grupo de melanoma familiar, e um paciente foi identificado como portador de uma variante germinativa (E318K) que seria um possível fator de risco para melanoma. A variante foi significativamente mais frequente em casos com histórico familiar de melanoma, indicando que este seria um gene de predisposição, o que destaca o poder da NGS na identificação de novas variantes raras associadas à predisposição a câncer. De maneira independente, outro grupo identificou a mesma variante E318K (que é uma substituição *missense* no gene *MITF*) em frequência aumentada em grupos de pacientes afetados por melanoma, por carcinoma de células renais ou por ambos quando comparados com controles (BERTOLOTTO et al. 2011). Assim, estes dois estudos de 2011 identificaram no gene *MITF* a mesma substituição *missense*, denominada E318K, que afeta a sumoilação desse gene,

identificando uma nova variante de risco moderado de predisposição a melanoma e/ou carcinoma de células renais (YEH 2011).

A partir de 2011, outros estudos utilizando abordagem NGS, como o sequenciamento de exoma, identificaram novos genes implicados na suscetibilidade ao melanoma (AOUDE et al. 2015). Alguns desses genes apresentam mutações de alta penetrância, como *BAP1*, *TERT*, *ACD*, *TERF2IP* e *POT1* (WIESNER et al. 2011; HORN et al. 2013; ROBLES-ESPINOZA et al. 2014; AOUDE et al. 2015).

O advento de novas tecnologias permitiu melhora no diagnóstico de indivíduos portadores de mutações em genes clássicos no melanoma familiar (*CDKN2A* e *CDK4*), assim como levou à identificação de novos genes de predisposição ao melanoma. Entretanto, o número de famílias afetadas por melanoma que permanece sem etiologia identificada ainda é elevado, provavelmente em decorrência do fato de que, com exceção de *CDKN2A*, a maioria dos genes explica uma porção muito pequena das famílias de melanoma. Assim, estudos buscando a identificação de novos fatores genéticos associados ao risco ao melanoma cutâneo permanecem atuais e relevantes.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O principal objetivo foi identificar variantes genômicas relacionadas à predisposição ao melanoma cutâneo em um grupo de pacientes afetados por melanoma hereditário e negativos para mutação patogênica no gene *CDKN2A*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar *CNVs* raras em um grupo de 41 pacientes não-relacionados com diagnóstico de melanoma hereditário, por meio da investigação de número de cópias genômicas utilizando a plataforma CytoSNP-850K BeadChip (Illumina).
- Busca de variantes genômicas germinativas raras, potencialmente patogênicas, em subgrupo de 5 famílias com diagnóstico de melanoma familiar, utilizando sequenciamento de exoma na plataforma Ion Proton (Life Technologies).
- Estudo das vias moleculares associadas aos genes identificados como candidatos para a predisposição hereditária.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA

O grupo estudado foi constituído por 41 indivíduos (Anexo 2) não relacionados afetados por melanoma cutâneo, pertencentes a 2 grupos:

(1) pacientes com diagnóstico clínico da Síndrome de Melanoma Familiar: (a) dois familiares de primeiro ou segundo grau com melanoma cutâneo; (b) famílias com um ou mais casos de melanoma cutâneo e um ou mais casos de melanoma ocular – **critério melanoma familiar**; esses critérios foram utilizados pelo consórcio GenoMEL e também foram utilizados em estudos prévios realizados na instituição ACCCC (GOLDSTEIN et al. 2007; MOREDO 2012).

(2) pacientes afetados por no mínimo dois melanomas primários sem histórico familiar de melanoma ou outras neoplasias associadas à síndrome – **critério melanomas múltiplos**.

Este estudo é retrospectivo, desenvolvido em colaboração com outros Departamentos do A.C.Camargo Cancer Center, tendo sido aprovado no comitê de ética em pesquisa sob o protocolo de número CEP 1728/12. Todos os pacientes dessa casuística foram ou ainda estão em acompanhamento no Núcleo de Câncer de Pele e Dermatologia da Instituição, tendo assinado termo de consentimento livre e esclarecido para o primeiro estudo de coleta de material (Comitê de Ética em Pesquisa - CEP 934/07; também aprovado no CONEP sob registro 14098) (Anexo 1). As amostras de DNA, provenientes de leucócitos retirados de sangue periférico

de pacientes, foram processadas no Laboratório de Macromoléculas vinculado ao Biobanco do A.C.Camargo Cancer Center; o material genômico excedente está armazenado no Biobanco.

Este grupo de paciente foi previamente avaliado no Departamento de Oncogenética pela Dra. Maria Isabel W. Achatz, tendo também sido extensamente caracterizado do ponto de vista clínico (MOREDO 2012), sob a supervisão do Dr. João Duprat, Diretor do Núcleo de Câncer de Pele e Dermatologia, colaboradores do presente projeto. Adicionalmente, este grupo de pacientes já foi investigado por sequenciamento Sanger quanto à presença de mutações nos genes *CDKN2A* (*p16/p14*) e *CDK4* (DE ÁVILA et al. 2014), em projeto conduzido pelo Dr Gilles Landman e pela Dra. Dirce M. Carraro, também pesquisadora da Instituição e colaboradora do projeto proposto, assim como foi investigado por nosso grupo por sequenciamento capilar quanto à presença de mutações no gene *MITF* e no promotor do gene *TERT* (PRAMIO et al. 2014).

3.2 MÉTODOS

3.2.1. Investigação de variação no número de cópias genômicas (CNVs)

Fizemos a avaliação de CNVs usando a plataforma CytoSNP 850K BeadChip (Illumina) que contém 850.000 sondas de SNPs distribuídas ao longo do genoma, com enriquecimento de sondas para 3,262 genes já associados a doenças constitucionais e câncer. Os procedimentos de marcação das amostras, hibridação e lavagem foram feitos de acordo com o protocolo do fabricante (Illumina). As lâminas de microarrays foram escaneadas usando o sistema iScan (Illumina) e os arquivos gtc

gerados pelo iScan foram carregados no software BluFuse Multi Software 3.2 (BlueGnome) para avaliação de qualidade do experimento e identificação das CNVs. As alterações de número de cópias foram detectadas utilizando os parâmetros a seguir: mínimo de 5 sondas consecutivas; valores de \log_2 ultrapassando o limiar definido para ganho ($>0,35$) ou perda ($>0,35$); tamanho mínimo de 100 kb. As alterações identificadas foram comparadas às CNVs reportadas no banco de dados *Database of Genomic Variants* (DGV; <http://projects.tcag.ca/variation/>); CNVs consideradas comuns (frequência $>1\%$ na população) foram excluídas. Selecionamos para apenas variantes raras (detectadas em $<1\%$ dos trabalhos do DGV) contendo genes. Em seguida, a frequência de tais variantes raras foi em um grupo controle de 400 indivíduos da população brasileira.

A descrição dos genes foi feita usando o *University of California Santa Cruz Genome Browser* (UCSC; <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>), o catálogo de mutações somáticas *COSMIC* (<http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/>) e o site *CBioPortal for Cancer Genomics* (<http://www.cbioportal.org/public-portal/>).

Quadro 1 - Bancos de dados utilizados para anotação das CNVs identificadas.

Banco de dados	Endereço
University of California Santa Cruz Genome Browser	http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway
COSMIC	http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/
CBioPortal for Cancer Genomics	http://www.cbioportal.org/public-portal/
Database of Genomic Variants	http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home

3.2.2 Sequenciamento de Exoma

Construção das bibliotecas genômicas

Para investigar a presença de variantes genômicas germinativas raras, realizamos o sequenciamento de exoma completo em 5 famílias não-relacionadas (probando e um parente, ambos afetados por melanoma cutâneo). A abordagem utilizada permite identificar alterações nas regiões codificadoras dos genes (exons), distribuídos em aproximadamente 37 Mb. Nosso desenho experimental estabelece que cada base seria sequenciada no mínimo 20x, para atingir um padrão mínimo de confiança na identificação de variantes germinativas.

O sequenciamento de exoma foi baseado no sistema Ion Proton (Ion Torrent, Foster City, USA), disponível na instituição AC Camargo Cancer Center. Este equipamento permite a avaliação completa de dois exomas por corrida, gerando fragmentos de 200 bases em cada molécula sequenciada. O kit utilizado para a confecção da biblioteca foi o *Ion TargetSeq Exome Enrichment for the Ion Proton System* (Life Technologies, Foster City, CA). Este kit oferece uma cobertura mais ampla do exoma, incluindo sítios doadores e aceptores de *splicing*, >99,4% dos CCDS (*consensus coding DNA*) e > 97% das variantes do COSMIC V56 (<100 bp). Além disso, o kit também captura a região 3'UTR dos genes, que inclui 44.100 sítios preditos de ligação a miRNA, além de 1.472 RNAs não-codificadores de proteínas como miRNAs, tRNAs, snoRNAs e lncRNAs.

A técnica consiste na fragmentação do DNA (concentração de 20ng/μl em 50μl - 1μg de massa de DNA total) por reação enzimática pela Ion Shear™ Enzyme Mix II (Life Technologies, Foster City, CA) por 30 minutos a 37°C, seguida pela purificação do DNA fragmentado utilizando *beads* magnéticas Agencourt AMPure

XP Reagent (Beckman Coulter), propiciando alta taxa de recuperação de fragmentos de DNA maiores que 100pb, o que pode ser verificado por análise no instrumento BioAnalyzer (Agilent Technologies).

Na etapa seguinte, foi realizado o reparo das extremidades dos fragmentos de DNA e subsequente ligação dos adaptadores A e P1 (um em cada extremidade dos fragmentos) para cada uma das amostras. Os adaptadores A são de vários tipos e contêm cada um deles uma sequência única, denominada *barcode*, que permite o sequenciamento de múltiplas amostras em uma mesma corrida se necessário, podendo separar cada fragmento após o sequenciamento por análise de bioinformática. Em seguida à ligação dos adaptadores, os fragmentos foram recuperados utilizando as *beads* magnéticas *Agencourt AMPure XP Reagent*.

Em seguida, foi realizado um procedimento de eletroforese, utilizando E-Gel Size-Select Agarose Gel 2%, pelo qual é possível recuperar apenas os fragmentos do tamanho desejado (250-350 pb), de acordo com um marcador de referência, que indica o momento em que devemos fazer a captura através do próprio gel. Após a captura dos fragmentos, é realizada uma nova purificação da amostra utilizando *beads* magnéticas *Agencourt AMPure XP Reagent* para retirada de possíveis contaminantes.

Uma vez que os fragmentos com adaptadores na faixa de tamanho ideal estão purificados, o passo subsequente é a amplificação dos mesmos. Para isso, é feita uma reação em cadeia da polimerase (PCR) com *primers* que são complementares aos adaptadores A e P1 previamente adicionados às extremidades dos fragmentos. Portanto, apenas fragmentos que possuem os dois adaptadores diferentes A e P1 ligados serão amplificados. Para essa reação, usamos a enzima *Platinum PCR*

SuperMix High Fidelity (Life Technologies, Foster City, CA), assim como o conjunto de *primers Library Amplification Primer Mix*. A ciclagem pode ser vista no quadro abaixo.

Quadro 2 - Ciclagem utilizada para a amplificação dos fragmentos de DNA.

Estágio	Passo	Temperatura	Tempo
 Holding 	Desnaturação do DNA	95°C	5 min
 8 ciclos 	Desnaturação do DNA	95°C	15 seg
	Anelamento	58°C	15 seg
	Extensão	70°C	1 min
 Holding 	Extensão	70°C	5 min
 Holding 	---	4°C	Até a próxima etapa

Após a amplificação, é realizada nova etapa de purificação utilizando as *beads* magnéticas *Agencourt AMPure XP Reagent*. Posteriormente, os fragmentos são novamente verificados por corrida no BioAnalyzer (Agilent Technologies) e Qubit dsDNA HS Assay (Invitrogen), com os objetivos de avaliar o perfil da biblioteca em termos de tamanho de fragmentos e quantificar cada amostra em termos de massa de DNA, respectivamente. É necessária uma massa genômica mínima para dar continuidade a construção da biblioteca, além do tamanho adequado dos fragmentos.

O próximo passo consiste da captura das regiões exônicas de cada amostra para construção das bibliotecas e posterior sequenciamento. Esta etapa inicia-se pela junção de 2 bibliotecas pareadas que serão hibridizadas com sondas biotilinas complementares a todas as regiões exônicas, em reação feita a 47°C por 72 horas. São adicionados, junto com as amostras de DNA, bloqueadores dos adaptadores A e P1, com o objetivo de evitar que sondas se liguem inespecificamente aos fragmentos

devido às sequências dos adaptadores. Após o período de hibridização, os fragmentos são capturados através de *beads* magnéticas *Dynabeads M-270 Streptavidin* (Life Technologies), sendo feitas lavagens para descarte de impurezas e fragmentos de DNA não-hibridizados. Em seguida, ocorre amplificação dos fragmentos, purificação e verificação do perfil das bibliotecas pelo BioAnalyzer (Agilent Technologies).

A seguir, iniciamos o processo de PCR em emulsão (ePCR), seguindo o protocolo do *Ion PI Template OT2 200 Kit v3* (Life Technologies). O procedimento se inicia com uma concentração total de 100 pM de cada biblioteca genômica em 100µL de volume final. Essa reação ocorre dentro de micelas formadas por uma mistura entre água e óleo feitas pelo equipamento *Ion OneTouch 2* (Life Technologies). Dentro de cada micela haverá uma *Ion Sphere Particle* (ISP – nanopartícula com sequências complementares às sequências dos adaptadores para que os fragmentos se liguem a elas) e apenas um fragmento que será amplificado, além dos reagentes necessários para tal reação. Ao final da reação, uma centrifugação feita pelo próprio equipamento precipita as ISPs com os fragmentos amplificados. O próximo estágio é a lavagem das ISPs para retirada de reagentes contaminantes e fragmentos não amplificados. Após a lavagem, procede-se ao enriquecimento dessas ISPs usando o equipamento *Ion OneTouch ES*, que por meio das *beads Dynabeads MyOne Streptavidin C1* recupera apenas as ISPs com fragmentos amplificados. Após o término desta etapa, as amostras estão prontas para o sequenciamento no equipamento *Ion Proton Sequencer*.

Sequenciamento no Ion Proton

Antes de iniciar o sequenciamento, é necessário realizar a limpeza do equipamento e do chip de sequenciamento utilizando NaOH 1M diluído em água ultrapura (18M Ω), feita automaticamente. Em seguida, todos os reagentes são carregados no equipamento, como tampões de lavagem e dNTPs. Após todo o ciclo de lavagem e inicialização do equipamento, prepara-se a amostra e os reagentes que farão o sequenciamento. Inicialmente, adicionam-se partículas controle da amostra enriquecida (*Ion PI Control Ion Sphere*), que servirão como controle da eficácia do sequenciamento. O preparo do chip de sequenciamento é feito com três lavagens utilizando isopropanol 100%, água (*nuclease-free water*) e NaOH 0,1M, em ordem determinada pelo protocolo da empresa Life Technologies (Cat. nº 4488315). A próxima etapa é carregar a amostra previamente preparada (55 μ L volume total) no chip de sequenciamento e centrifugá-lo por 10 minutos na *Ion Chip Minifuge*, para que cada poço do chip contenha apenas uma ISP com o fragmento a ser sequenciado. É adicionado o tampão de anelamento e a enzima *Ion PI Sequencing Polymerase* ao chip, sendo feita uma ciclagem de centrifugações para distribuição homogênea pelo mesmo. Este procedimento é realizado para que nenhum poço contendo fragmentos a serem sequenciados fique sem os reagentes necessários. Então, o chip está pronto para ser colocado no equipamento e ocorrer o sequenciamento da amostra.

Análise de bioinformática

Para a análise dos dados gerados, o conjunto de procedimentos sequenciais (*pipeline*) utilizado consiste de um primeiro passo de alinhamento das sequências produzidas contra do genoma humano (Hg19), utilizando o software TMAP (torrent

mapper 4.2.18 (6b3fd1b) (201408050144); em passo adicional, é realizada a exclusão das sequências de *primers/adaptadores*.

A chamada de variantes genômicas é realizada em duas etapas: **(a)** primeiramente, utilizando o software TVC 4.0-5 (72041) - Torrent Variant Caller, seguindo o *pipeline* do iontorrent (<http://mendel.iontorrent.com/ion-docs/>); **(b)** posteriormente, as variantes são re-validadas através da análise da *pipeline* GATK (<https://www.broadinstitute.org/gatk/guide/best-practices?bpm=DNaseq>).

Um problema de sequenciadores baseados em alteração de pH para leitura de bases como o utilizado em nosso estudo (Ion Proton) é que esses apresentam taxas de erro de sequenciamento relativamente alta em certas regiões do genoma que contém repetição de bases (homopolímeros). Isso leva ao aparecimento de falsos SNVs e, principalmente, INDELS, problema a ser considerado para todos os reads gerados nesses equipamentos.

Para corrigir tais erros, foi aplicada uma estratégia desenvolvida pela equipe de Bioinformática da instituição que ajuda aumentar a acurácia da detecção de variantes e também de remoção de INDELS erroneamente identificadas. Essa estratégia baseou-se na utilização de duas métricas geradas pelo programa GATK durante a etapa de identificação de variantes (*variant calling*). Essas duas métricas são: QD (*quality by depth*) e FS (*strand bias*). O QD é a medida de qualidade da base, conhecida como PHRED Score, dividida pela sua cobertura (*read depth*). Através de comparação da distribuição de QD entre as variantes encontradas em reads gerados por outra plataforma, com menor taxa de erro em regiões de homopolímero (Illumina HiSeq) e também em variantes encontradas em reads de Ion Proton mas validadas em sequenciamento Sanger, definimos um limiar de QD = 2,

de modo que variantes com QD menor que 2 ($QD < 2$) são removidas das análises. O FS representa o possível viés no aparecimento da variante em apenas uma das orientações de leitura (+ ou -) de um mesmo target. Normalmente, espera-se que a variante apareça nas duas orientações de leitura. Caso exista uma associação estatística entre a variante e uma certa orientação do read, o p-valor do teste de associação (teste de Fisher) será baixo. O FS é o $-\log_{10}$ deste p-valor e, portanto, quanto maior for o FS, maior será o viés de orientação. Assumindo p-valor $< 0,05$ como significativo, valores de FS acima de 1,3 indicam um viés significativo e, portanto, variantes com $FS > 1,3$ foram removidas.

A anotação das variantes foi realizada usando o software SnpEff version 3.5d (build 2014-03-05) e um *script* desenvolvido *in house* pela equipe de Bioinformática da Instituição, com a anotação das variantes identificadas pela utilização dos bancos públicos: dbNSFP (<http://sites.google.com/site/jpopgen/dbNSFP>) version 2.4; COSMIC v69; 1000 genomes; ESP (Exome Variant Server - <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>) version ESP6500SI-V2; HapMap; dbSNP version 138.

Além disso, utilizamos o software VarSeq (Golden Helix) para uma análise independente. A partir da anotação, buscamos identificar variantes genômicas raras (frequência populacional $< 0,1\%$), detectadas com segurança - cobertura mínima de 50 reads (50x) – e qualidade de base variante (*Phred score* > 20), consideradas por pelo menos 2 algoritmos diferentes como variantes potencialmente danosas à função proteica (de acordo com a compilação do banco de dados dbNSFP; *database for nonsynonymous SNPs' functional predictions*), e que fossem detectadas nos dois afetados da mesma família.

O Quadro 3 lista os bancos de dados utilizados para anotação das variantes identificadas no sequenciamento de exoma.

Quadro 3 - Bancos de dados utilizados para anotação das variantes identificadas.

Banco de dados	Endereço
dbNSFP*	http://sites.google.com/site/jpopgen/dbNSFP
COSMIC	http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/
1000 Genomes	http://www.1000genomes.org/
Exome Variant Server	http://evs.gs.washington.edu/EVS/
International HapMap Project	http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/
dbSNP Short Genetic Variations	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/

*dbNSFP – banco de dados que compila diversos algoritmos de variantes preditas como danosas à função protéica, dentre eles 5 que nós utilizamos para avaliar nossos dados (SIFT, Polyphen2, LRT, MutationTaster, MutationAssessor, FATHMM)

4 RESULTADOS

4.1 ESTUDO DE ALTERAÇÕES NO NÚMERO DE CÓPIAS GENÔMICAS - CNVS

Na primeira parte do estudo, um grupo de pacientes de melanoma preenchendo critérios para melanoma hereditário foi avaliado quanto ao padrão de CNVs germinativas.

4.1.1 Melanoma e neoplasia pancreática intraepitelial

Estudamos 3 pacientes afetados por melanoma e neoplasia pancreática intraepitelial, sem mutações ou deleções do gene *CDKN2A*. Em um dos pacientes, duas CNVs raras germinativas grandes (> 300kb) foram detectadas; as duas alterações eram duplicações e continham genes. Outro paciente apresentou deleção do cromossomo Y inteiro; entretanto, este é um evento que pode ter ocorrido devido à idade avançada do mesmo (79 anos). Esses dados apontam para a possibilidade de CNVs raras estarem contribuindo para a predisposição ao câncer, neste caso melanoma e neoplasia intraepitelial do pâncreas. Tais resultados foram publicados na revista *Experimental and Molecular Pathology: Association of melanoma with intraepithelial neoplasia of the pancreas in three patients* (Anexo 4) (FIDALGO et al. 2014).

RESEARCH ARTICLE

For reprint orders, please contact: reprints@futuremedicine.com

Role of rare germline copy number variation in melanoma-prone patients

Felipe Fidalgo¹, Tatiane Cristina Rodrigues², Amanda Gonçalves Silva²,
Luciana Moredo Facure³, Bianca Costa Soares de Sá³, João Pedreira
Duprat³, Maria Isabel Achatz⁴, Carla Rosenberg², Dirce Maria Carraro¹
& Ana Cristina Victorino Krepsich^{*2}

Aim: This work evaluates a possible causative role for germline copy number variants (CNVs) in melanoma predisposition. **Patients & methods:** A total of 41 melanoma-prone Brazilian patients were investigated for CNVs using 850K single nucleotide polymorphism arrays. **Results:** Ten rare CNVs were identified in nine patients, comprising 54 known genes, mostly related to cancer. *In silico* analyses revealed gene enrichment for cellular development and growth, and proliferation, highlighting five genes directly associated with the melanoma phenotype (*ANGPT1*, *IDH1*, *PDE5A*, *HIST1H1B* and *GCNT2*). **Conclusion:** Patients harboring rare CNVs exhibited a decreased age of disease onset, in addition to an overall higher skin cancer predisposition. Our findings suggest that rare CNVs contribute to melanoma susceptibility, and should be taken into account when investigating cancer risk factors.

First draft submitted: 30 October 2015; Accepted for publication: 26 February 2016; Published online: 29 March 2016

Although melanoma represents only 4% of all skin cancers, it is responsible for up to 80% of mortality associated with this type of cancer due to high aggressiveness. Early detection and surgical removal remain as the gold standard treatments for prolonged survival [1,2]. The skin cancer phenotype is known to be strongly modulated by environmental factors, largely UV exposure, which is the major risk factor for cutaneous melanoma.

The genetic basis of melanoma susceptibility is complex and not fully understood [3]. Approximately 10% of melanoma cases are triggered by germline mutations which are highly penetrant, mainly affecting the p16 isoform of the *CDKN2A* gene [4]. Still, the major predisposition gene *CDKN2A* accounts only for part of familial melanoma cases, and mutations disrupting other genes, such as *CDK4* [5], *BAP1* [6], *MITF* [7] and *TERT* promoter [8], are very uncommon events mostly described in isolated families.

Copy number variations (CNVs) are stretches of DNA that present a variable copy number among individuals, and are known to compose the genetic background of general populations in addition to single nucleotide polymorphisms (SNPs) [9,10]. CNVs can modulate human phenotypes through changes in gene expression thus contributing to the uniqueness of each individual [11]. Many CNVs identified to date, frequently the rare ones, are the basis of several human diseases, including mental impairment [12,13] and cancer susceptibility [14–20].

Germline mutations of known cancer predisposition genes account for <50% of the melanoma-prone families. Therefore, the goal of this work was to search for rare CNVs potentially related to

KEYWORDS

- *ANGPT1* • cancer predisposition • CNV
- copy number variation
- familial melanoma • *GCNT2*
- germline • *HIST1H1B*
- histone cluster • *IDH1*
- melanoma-prone • *PDE5A*
- sporadic multiple primary melanomas

¹International Research Center, AC Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil

²Department of Genetics & Evolutionary Biology, Institute of Biosciences, University of São Paulo, Brazil

³Department of Skin Cancer, AC Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil

⁴Department of Oncogenetics, AC Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil

*Author for correspondence: Tel.: +55 112 648 7473; ana.krepischi@ib.usp.br

melanoma predisposition through the evaluation of 41 melanoma-prone patients who tested negative for *CDKN2A* mutations.

Patients & methods

• Genomic samples

This retrospective study was conducted at the AC Camargo Cancer Center (ACCCC; Sao Paulo, Brazil), and it was approved by the Internal Ethics Committee Board (#1728/12). Melanoma patients were referred to the Skin Cancer Department of the ACCCC, which surveyed gender, age at blood draw, number of melanomas and metastasis occurrence. Family history of cancer was accessed by the Oncogenetics Department, and genetic counseling was provided to all participants. The probands were previously screened for germline mutations affecting *CDKN2A* and *CDK4* [21], *TERT* promoter mutations and *MITF* E318K variant [22].

The cohort comprised 41 unrelated probands either fulfilling the classical criteria for familial melanoma syndrome [23] or selected based on evidence of a strong genetic predisposition due to the occurrence of ≥ 2 primary skin melanomas ($n = 13$) [24]. Seven of these patients fulfilled both familial and multiple primary melanoma criteria. Clinical data of the patients can be found in the **Supplementary Table 1**. Samples from patients were provided by the ACCCC Biobank. DNA samples were obtained from peripheral blood using a standard phenol:chloroform protocol.

• DNA CNV assessment

Evaluation of CNVs were performed using the CytoSNP 850K BeadChip (Illumina) which contains 850,000 SNP probes covering the whole genome, with enriched coverage for 3262 well-known genes of constitutional and cancer diseases (The International Collaboration for Clinical Genomics [25]). Labeling, hybridization and washing procedures followed the manufacturer's instructions. Microarray slides were scanned using the iScan System (Illumina), and the gtc files were loaded on the BlueFuse Multi Software v3.2 (BlueGnome) to evaluate experimental quality and for CNV calling. CNV identification were based on the presence of at least five consecutive probes with \log_2 values > 0.35 (duplications) or < -0.35 (deletions) and a minimum size of 100 kb.

The detected CNVs were compared with variants reported in the Database of Genomic Variants (DGV [26]; freeze April 2015) aiming to

exclude common variants. For calculating CNV frequencies in general population, we downloaded the data from $> 11,000$ individuals documented in different studies deposited in DGV employing oligoarrays, similarly to our study (studies using bacterial artificial chromosome arrays were excluded). Only CNVs harboring genes and presenting frequencies $< 1\%$ among the control individuals from DGV were selected for further validation (thereafter referred as rare CNVs).

• Copy number validation by real-time quantitative PCR

In order to validate selected rare CNVs, quantitative PCR (qPCR) was performed using the SYBR Green system (Applied Biosystems) on a 7500 System apparatus (Applied Biosystems) with a reference DNA (Promega) as control for copy number calibration. The probes covered part of the coding sequence of one of the genes mapped within each CNV (**Supplementary Table 2**). Values were normalized based on qPCR data obtained for *GAPDH* (12p13) and *HPRT* (Xq26.2). Triplicates were analyzed using the comparative $2^{-\Delta\Delta C_t}$ cycle threshold method [27]. Values in the range of 0.8–1.2 indicated two DNA copies, < 0.6 and > 1.4 were considered copy number loss and copy number gain, respectively.

• Gene annotation

First, gene annotation was performed using the University of California Santa Cruz Genome Browser (UCSC; [28]), and the Catalog of Somatic Mutations (COSMIC; [29]). The set of known genes encompassed by rare CNVs was analyzed using the Ingenuity Pathway Analysis (IPA) software [30] for identification of representative networks. Analysis was performed using core analysis tool, considering Ingenuity KnowledgeBase (genes + endogenous chemicals), only human species, only primary and melanoma cell lines. We selected only networks presenting significant enrichment for the set of genes affected by rare CNVs. Additionally, the online tool VarElect [31] was applied in variant genes for prioritization based on disease/phenotype of interest (skin cancer and melanoma). Furthermore, the frequency of genetic alterations for this set of genes was investigated in tumor samples of melanomas using publically available data deposited on The Cancer Genome Atlas (TCGA; [32]); this analysis was performed using the CBioPortal for Cancer Genomics tool [33,34].

Results

The CNV germline profile of 41 melanoma-prone individuals was investigated by SNP arrays, and ten rare alterations were identified in nine probands, accounting for 22% of our cohort. None recurrent rare CNV was detected. Among the nine probands carrying rare CNVs, six were familial cases, and three were sporadic patients who developed multiple primary melanomas at early age. Concerning the familial cases, we were unable to test the segregation of the CNVs with the melanoma phenotype since affected relatives were either deceased or unavailable. The group of melanoma-prone patients carrying rare CNVs presented an early age of disease onset (mean of 37.4 years), which was significantly lower than the overall mean age of the total group of patients (45.8 years; p -value = 0.0325, t -test).

The ten rare CNVs presented an average genomic size of approximately 458.6 kb, ranging from 0.12 to 1.35 Mb, comprising seven duplications and three deletions. Genomic coordinates of the affected genomic segments as well as genes mapped within each CNV are detailed in **Table 1**.

All of the rare CNVs were technically validated through qPCR. **Figures 1 & 2** present data from four different CNVs, including the qPCR validation for genes *ESF1* (**Figure 1C**), *IDH1* (**Figure 1G**), *SFTPA2* and *ANXA11* (**Figure 2C**). The **Supplementary Figure 1** depicts qPCR data for the remaining six CNVs, affecting the *MGST1*, *HIST1H1B*, *PAK1IP1*, *ANGPT1*, *KIAA0020* and *MAD2L1* genes (see **Table 1**), respectively.

According to the analysis using the Database of Genomic Variants, some of these CNVs were occasionally reported in individuals from general population; however, either their frequency in the database was <1% (our definition of rare variant herein) or the reported DGV variants spanned only partially the entire genomic region of the rare CNVs here described. To exclude the possibility that these ten rare CNVs represent common variants of the Brazilian population, we investigated germline CNV data previously obtained with the same 850K SNP array platform from approximately 400 individuals, which were studied in our laboratory for reasons other than cancer. None of the alterations here documented were detected in this control group, indicating that they are rare variants also in the Brazilian population.

The (**Figure 1**) exhibited results of two different patients, one of them carrying the largest

CNV identified in this study (Patient ID 26; **Figure 1A–D**): a 1.35 Mb duplication at 20p12.1 (**Figure 1A & B**), encompassing among others the *ESF1* gene, which was chosen to validate by qPCR the gain in copy number (**Figure 1C & D**). The second alteration (**Figure 1E–H**, Patient ID 42) shows a 146 kb deletion mapped at 2q33.3q34, which encompasses, among others, the *IDH1* gene.

A complex chromosomal rearrangement was detected in a sporadic multiple melanoma patient diagnosed at 31 years (Patient ID 2); this rearrangement is composed by a duplication contiguous to a deletion (**Figure 2**) at 10q22.3; the 350 kb duplication affected, among others, the *ANXA11* gene, and the adjacent 125 kb deletion harbored *SFTPA1* and *SFTPA2* genes.

Information regarding SNP array profiles, qPCR validation and affected genomic segments for the remaining six rare CNVs are presented in **Supplementary Figure 2A–F**.

The ten rare CNVs identified in this group of melanoma-prone patients cover 54 known genes (see **Table 1**). Using IPA, a major network comprising nine out of these 54 genes (*ANGPT1*, *SFTPA1*, *TMEM14C*, *PDE5A*, *IDH1*, *MAD2L1*, *HIST1H1B*, *SFTPD* and *VLDLR*) was disclosed, mainly enriched for cellular development, cellular growth and proliferation (**Supplementary Table 3**). Additional 26 genes were automatically included in the network since they were identified as biologically linked to the nine genes based on scientific evidence (**Figure 3**).

Using the online tool Varelect for gene prioritization based on phenotype, the enquiry disclosed that 34/54 of the genes mapped within the rare CNVs are related to cancer. Five of these genes have been reported to play a role in melanoma cells (*ANGPT1*, *IDH1*, *PDE5A*, *HIST1H1B* and *GCNT2*), four of them belonging to the set of nine genes highlighted in the network created by IPA analysis. Considering the remaining five genes of the IPA network (*MAD2L1*, *SFTPD*, *VLDLR*, *SFTPA1* and *TMEM14C*), they are indirectly related to melanoma due to interactions with major genes from pathways such as control of cell cycle (*CDK4*, *CDKN2A*, *RBI*), melanin production and melanocyte differentiation (*MITF* and *TYR*), and angiogenesis (*VEGFA*).

We also evaluated the frequency of genetic alterations affecting the set of 54 genes, using publically available data of tumors deposited in TCGA. A relative high frequency of alterations,

Table 1. Description of ten rare germline copy number variants detected in nine unrelated melanoma-prone patients, with respective clinical data of the individuals, cytogenetic mapping and International System for Human Cytogenetic Nomenclature 2013 description with genomic positions (GRCh37), genomic sizes, type of copy number event and known genes mapped in the segment.

Clinical presentation	Patient ID [†]	Age at diagnosis (years)	Melanomas (n)	Cytoband	ISCN 2013	Size (kb)	CNV type	Genes
Familial melanoma	42	45	1	2q33.3q34	arr 2q33.3q34(208,961,424-209,107,426)x1	146	Del	CRYGD, CRYGC, CRYGB, CRYGA, C2orf80, IDH1
Familial melanoma	14	42	1	6p22.1	arr 6p22.1(27,725,502-27,998,258)x3	272	Dup	HIST1H2BL, HIST1H2AI, HIST1H3H, HIST1H2AJ, HIST1H2BM, HIST1H4J, HIST1H4K, HIST1H2AK, HIST1H2BN, HIST1H2AL, HIST1H1B, HIST1H3I, HIST1H4L, HIST1H3J, HIST1H2AM, HIST1H2BO, OR2B2, OR2B6
Familial melanoma	57	34	1	6p24.3	arr 6p24.3-p24.2(10,536,889-10,762,997)x1	226	Del	GCNT2, C6orf52, PAK1P1, TMEM14C, TMEM14B, MAK
Familial melanoma	2	31	2	10q22.3	arr 10q22.3(81,577,614-81,924,830)x3	347	Dup	SFTPD, TMEM254-AS1, TMEM254, PLAC9, ANXA11
Familial melanoma	68	44	1	10q22.3 12p12.3	arr 10q22.3(81,294,920-81,419,822)x1 arr 12p12.3(16,419,405-16,819,159)x3	125 399	Del Dup	SFTPA1, SFTPA2 SLC15A5, MGST1, LMO3
Familial melanoma	26	53	1	20p12.1	arr 20p12.1(12,639,060-13,985,560)x3	1346	Dup	SPTLC3, ISM1, ISM1-AS1, TASP1, ESF1, NDUFAF5, SELIL2, MACROD2
Multiple melanomas	55	22	5	4q26q27	arr 4q26-q27(120,326,323-121,139,889)x3	813	Dup	PDE5A, MAD2L1
Multiple melanomas	53	25	2	8q23.1	arr 8q23.1(108,226,806-108,463,603)x3	236	Dup	ANGPT1
Multiple melanomas	64	41	2	9p24.2	arr 9p24.2(2,425,428-3,101,626)x3	676	Dup	VLDLR, KCNV2, KIAA0020

Bold genes represent genes selected for quantitative PCR validation.

[†]ID: patient identification according to **Supplementary Table 1**.

Del: Deletion; Dup: Duplication; ISCN: international System for Human Cytogenetic Nomenclature.

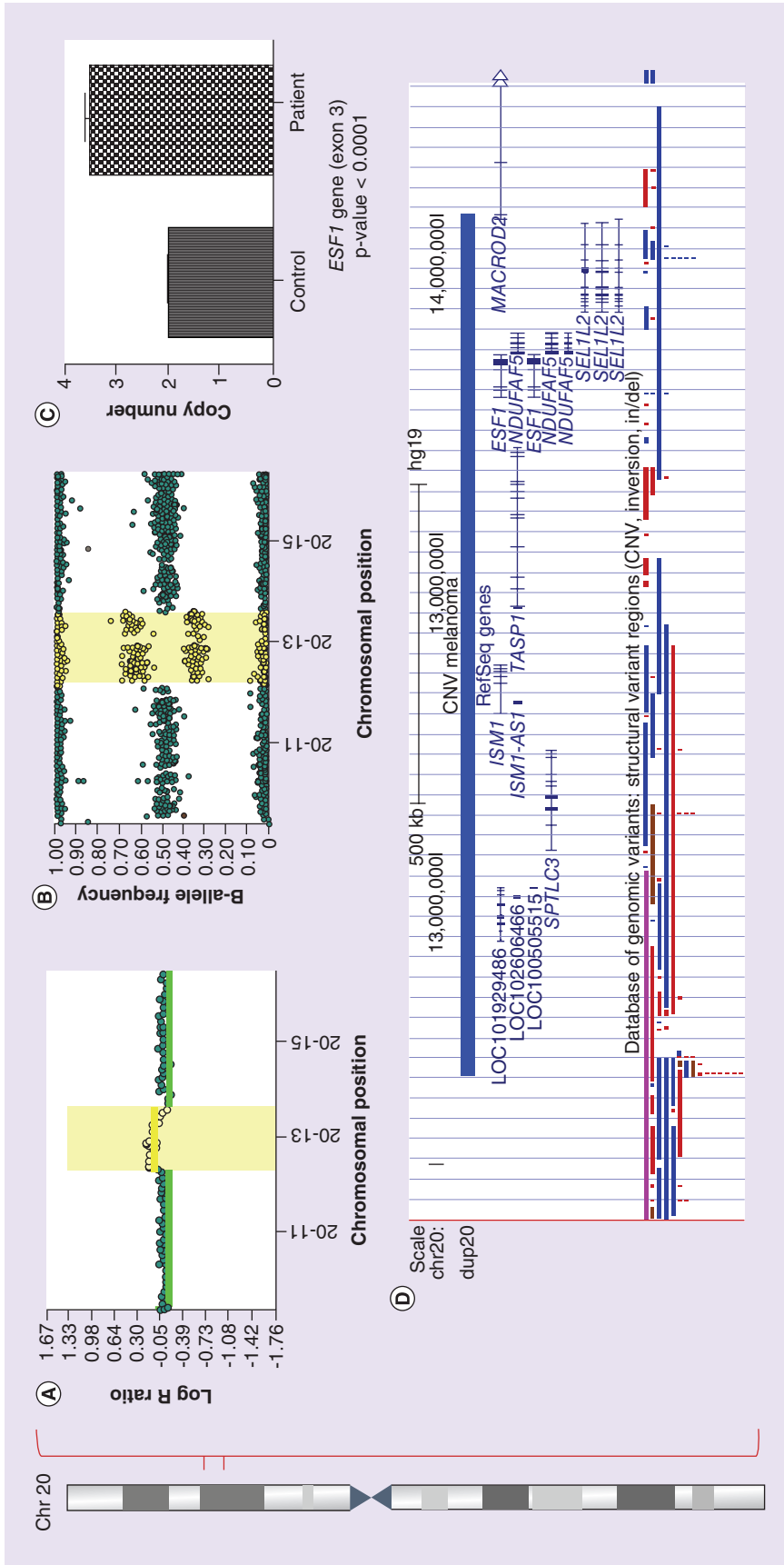


Figure 1. Germline copy number variations detected in two unrelated familial melanoma patients using the 850K single nucleotide polymorphism array. (A–D) 20p12.1 duplication detected in patient 26. **(A)** Probes above the baseline 0 of the Log₂ ratio of the probe intensities (Log R ratio) representing the duplicated segment at 20p12.1 are highlighted (yellow box). **(B)** The plot of the B-allele frequency exhibiting the pattern of the 20p12.1 duplication is highlighted (yellow). **(C)** The graph depicts the validation by quantitative PCR of the copy number gain of the investigated gene *ESF1* in the melanoma-prone patient carrying the duplication at 20p12.1. **(D)** The affected genomic segment at 20p12.1 is shown using the University of California Santa Cruz Genome Browser, encompassing eight genes (*SPTLC3*, *ISM1*, *ISM1-AS1*, *TASPI1*, *ESF1*, *NDUFAF5*, *SEL1L2*, *MACROD2*).
CNV: Copy number variation.

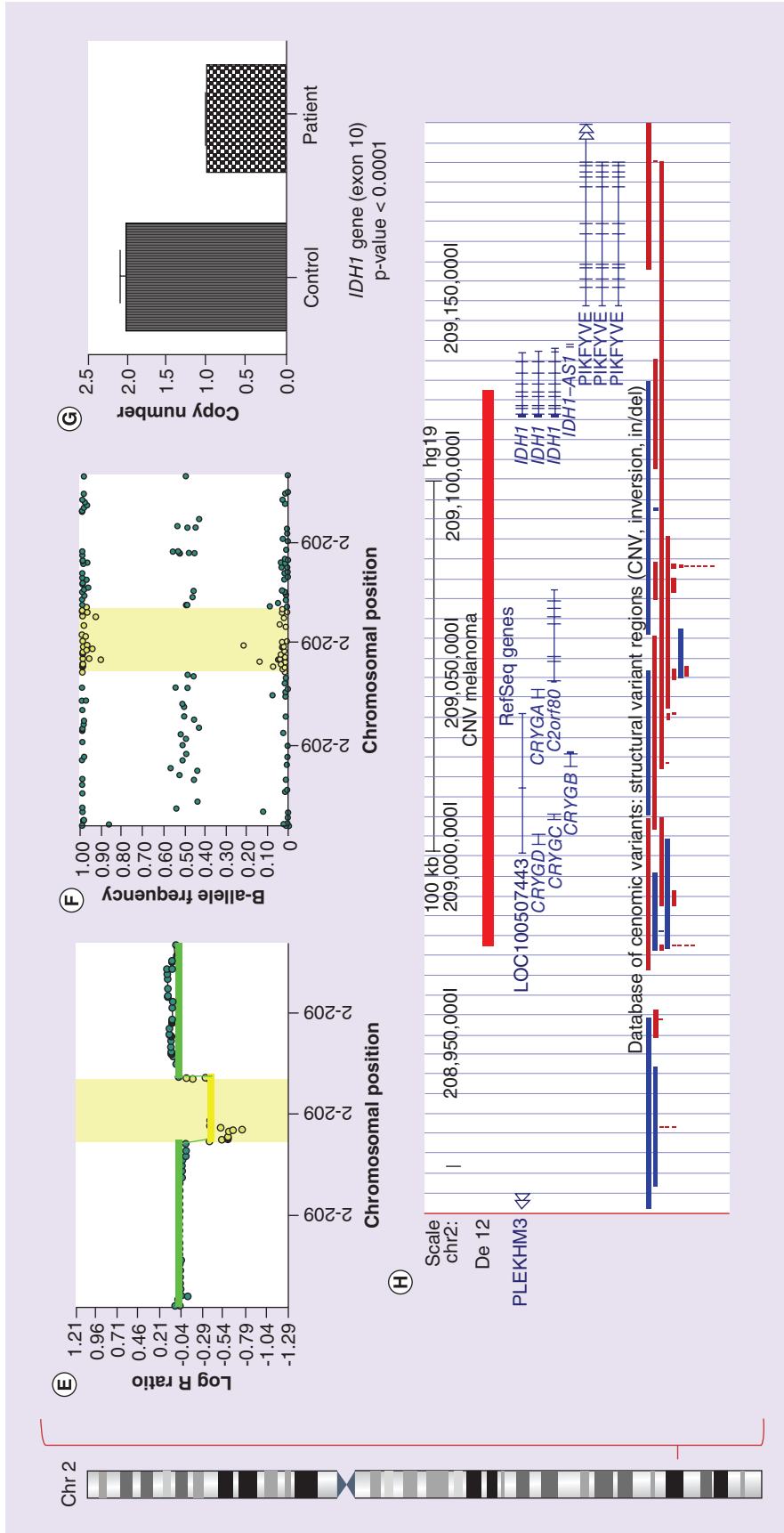


Figure 1. Germline copy number variations detected in two unrelated familial melanoma patients using the 850K single nucleotide polymorphism array (cont.).
 (E–F) 2q33.3q34 deletion detected in patient 42. (E) Probes above the baseline 0 of the Log R Ratio representing the deleted segment at 2q33.3q34 are highlighted (yellow). (F) The plot of the B-allele frequency exhibiting the pattern of the 2q33.3q34 deletion is highlighted (yellow). (G) The graph depicts the validation by quantitative PCR of the copy number loss of the investigated gene *IDH1* in the melanoma-prone patient carrying the deletion at 2q33.3q34. (H) The affected genomic segment at 2q33.3q34 is shown using the University of California Santa Cruz Genome Browser, encompassing six genes (*CRYGD*, *CRYGC*, *CRYGB*, *CRYGA*, *C2orf80*, *IDH1*).
 CNV: Copy number variation.

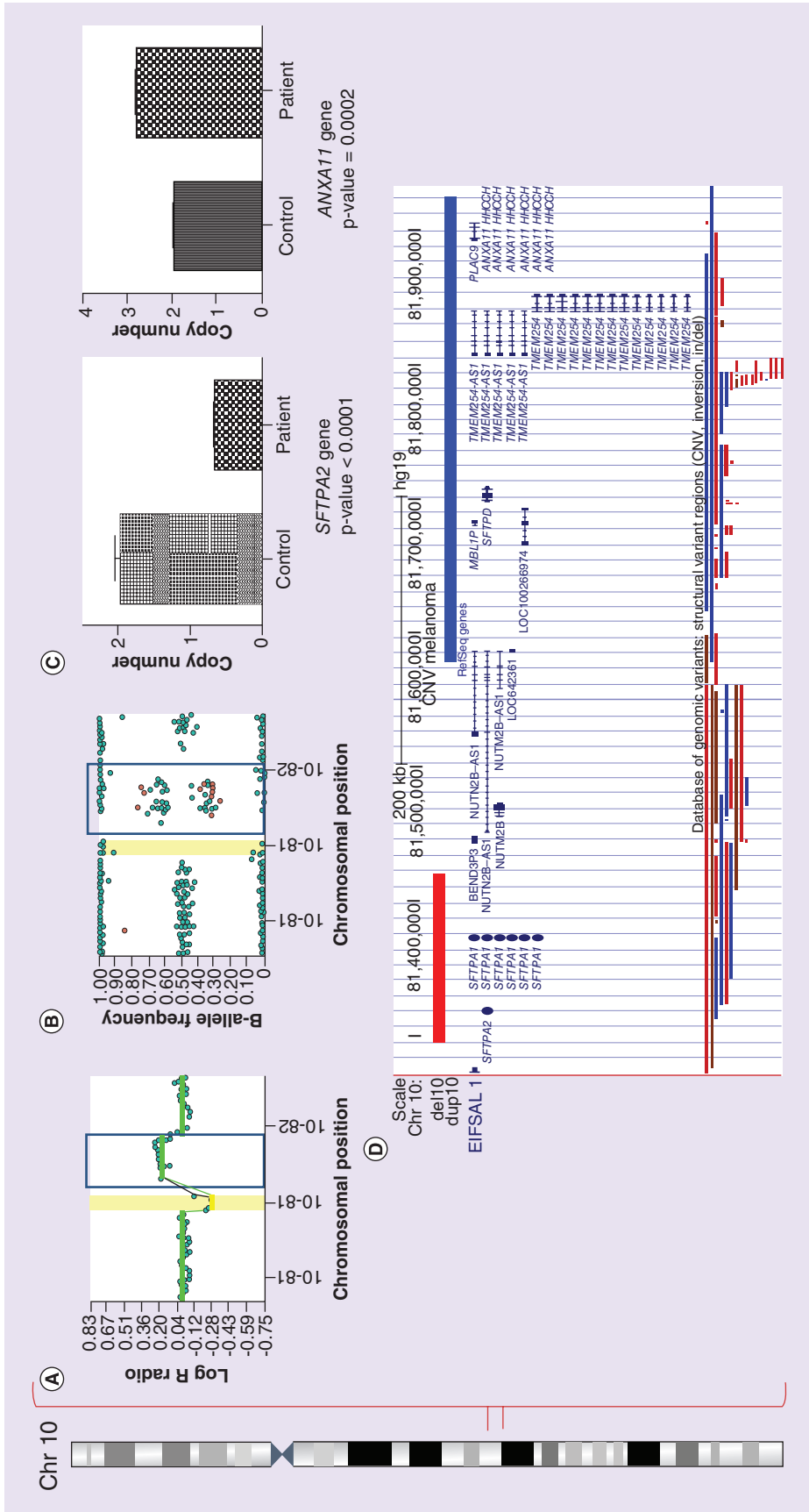


Figure 2. A complex chromosomal rearrangement detected in the patient 2 (sporadic multiple primary melanomas), showing a pattern of adjacent duplication and deletion at 10q22.3. (A) Probes below the baseline 0 of the Log₂ ratio of the probe intensities (Log R ratio) representing the deleted segment at 10q22.3 are highlighted in yellow, and probes above the baseline 0 of the Log R Ratio representing the duplicated segment are indicated by a blue box. **(B)** The plot of the B-allele frequency exhibiting a pattern of deletion and duplication are highlighted in yellow and by a blue box, respectively. **(C)** The graphs depict the validation of the copy number changes by quantitative PCR of the investigated genes (*SFTPA2* for deletion, *ANXA11* for duplication) in the melanoma-prone patient carrying the complex rearrangement at 10q22.3. **(D)** The affected genomic segment at 10q22.3 is shown using the University of California Santa Cruz Genome Browser, encompassing a total of seven genes (*SFTPD*, *TMEM254-AS1*, *TMEM254*, *PLAC9*, *ANXA11*, *SFTPA1* and *SFTPA2*). CNV: Copy number variation.

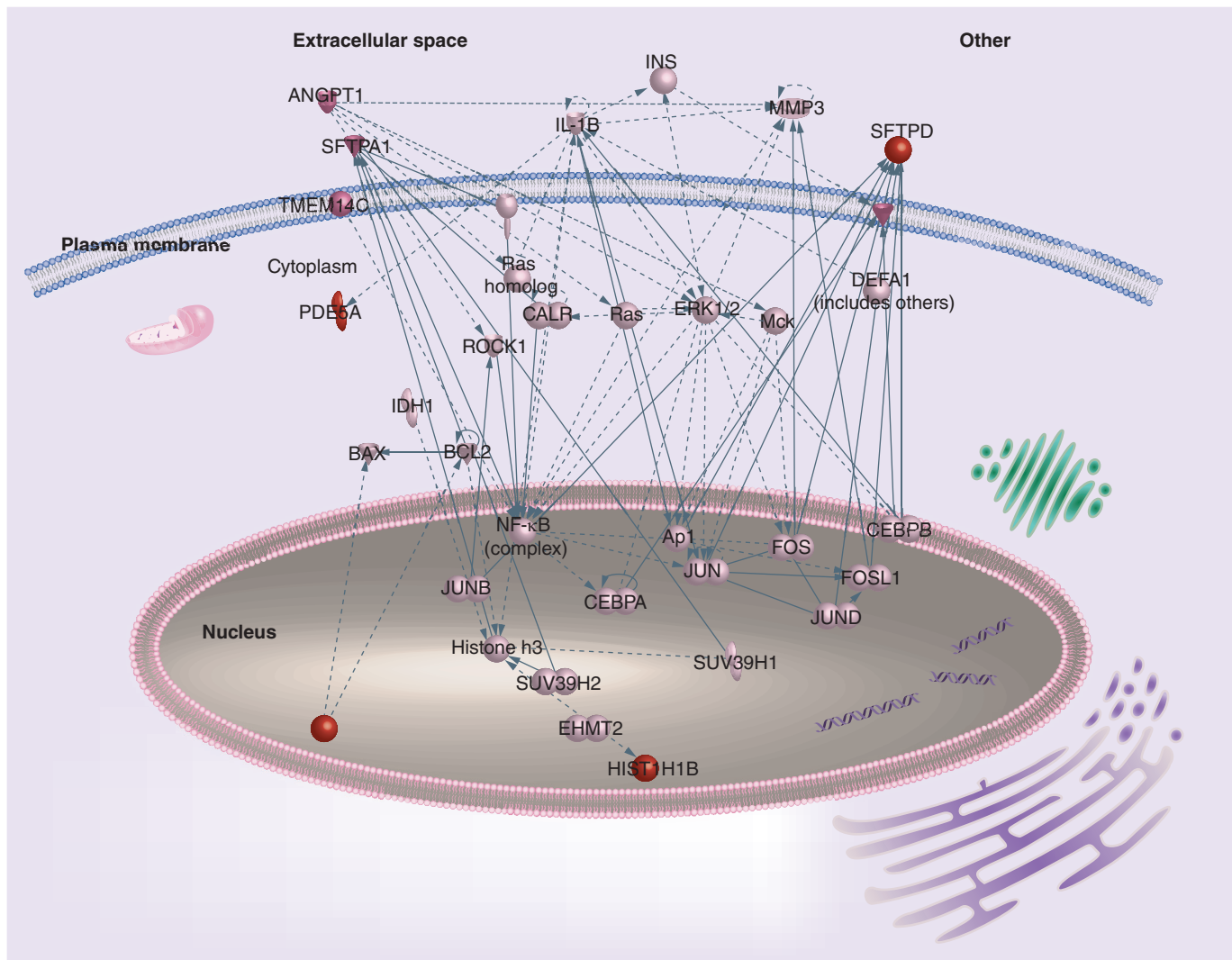


Figure 3. Network of nine genes mapped within most of the genomic segments exhibiting rare germline copy number variations detected in melanoma-prone patients. Cellular diagram of the network created by the Ingenuity Pathway Analysis based on interactions of nine of the 54 genes affected by rare copy number changes. Red and light red nodes represent either duplicated or deleted genes, respectively (see Table 1); uncolored nodes represent additional 26 genes automatically included in this network since they were identified as biologically connected to the others based on scientific evidence. The functional categorization of this network was gene expression, cellular development, cellular growth and proliferation.

mostly mutations and copy number gains of these genes were detected in all tumor types in general (Supplementary Figure 3A). In particular, approximately 50% of the 262 melanoma samples present alterations in any of these genes, particularly amplifications of genes *ANGPT1*, and all the genes of the 6p22.1 histone cluster (Supplementary Figure 3B), which also displayed a pattern of copy number gain in the rare CNVs here detected.

Discussion

Approximately 60% of all familial melanoma cases have unknown genetic etiology [4], and

recently germline copy number variations affecting known cancer genes were associated with increased cancer predisposition [16]. Phenotypic consequences of CNVs are likely caused by haploinsufficiency in deletion CNVs whereas duplications can lead to modification of expression patterns through direct gene dosage change, gene disruption or gene fusion at breakpoints creating novel transcripts [35,36].

Only two studies have investigated the role of germline CNVs in melanoma predisposition, one of them disclosing a 257 kb 4q13 duplication segregating in one melanoma family [15],

which encompassed several genes of the *CXC* family, already implicated in melanoma development [37]. The second work was conducted by our group in patients exhibiting association of skin melanoma with intraepithelial neoplasia of the pancreas [19], revealing two large (>300 kb) duplication CNVs in one of the patients. Here we extended the investigation of a possible causative role for rare CNVs as a susceptibility melanoma factor, studying a cohort of 41 melanoma-prone patients negative for mutations in the major melanoma predisposition genes.

Ten rare CNVs were detected in nine patients (22% of the group), mostly duplications, with an average size (458.6 kb mean) larger than that reported for general population [38–40], even excluding the largest CNV here identified. In previous studies, we had observed large germline CNVs in pediatric cancer [41], and also in familial and early-onset breast cancer [17]. Most of the patients harboring rare CNVs were familial cases, and, interestingly, the melanoma-prone patients carrying rare CNVs presented an age of disease onset that was significantly lower than the overall mean age of the group of patients. One could argue that these germline rare CNVs might add to the individual risk for melanoma development by decreasing the age of onset. Additionally, two of the patients carrying rare CNVs (patients 22 and 55) were included in the cohort of melanoma predisposition because of early onset of cancer and the occurrence of more than one primary lesion, in addition to the development of basal cell carcinomas, suggesting an overall higher cancer predisposition.

The *in silico* analyses of the set of affected genes disclosed that they were mostly related to cancer, five of them directly associated with the melanoma phenotype (*ANGPT1*, *IDH1*, *PDE5A*, *HIST1H1B* and *GCNT2*). A network enriched for genes in the categories of cellular development, cellular growth and proliferation was disclosed, containing four genes with a reported role in melanoma cells (*ANGPT1*, *IDH1*, *PDE5A* and *HIST1H1B*), likely most relevant for the phenotype, while the remaining five (*MAD2L1*, *SFTPD*, *VLDLR*, *SFTPA1* and *TMEM14C*) were indirectly related due to interactions with pathways such as control of cell cycle, melanocyte development and pigmentation signaling, and angiogenesis. It is noteworthy that almost all rare CNVs carried at least one gene included in this major network (eight out of ten CNVs). Possibly, the other genes mapped

within the CNVs were just ‘carried along’ in the same genomic segments affected by the copy number alterations; however, although the role of these remaining genes is currently unclear in melanoma, we cannot exclude that they are similarly implicated in the phenotype.

Among the early-onset melanoma patients with additional skin cancer, one of them developed five melanomas, carrying a large approximately 800 kb duplication CNV at 4q26q27 that encompasses only two genes, *PDE5A* and *MAD2L1*. *PDE5A* is a potential target in cancer therapy since it stimulates cell proliferation and survival, including melanoma cells [42], and its inhibition promotes apoptosis of tumor cells [43–45]. Furthermore, *MAD2L1* is a major mitotic checkpoint gene already implicated in several cancer types such as lung [46].

Regarding the largest rearrangement detected in this cohort, a 1.3 Mb duplication at 20p12.1, *in silico* analysis [47,48]) of the affected genes identified a possible interaction between *MACROD2* and *TERF2*; the *TERF2* gene is a shelterin that was recently associated with the number of *nevi* in melanoma patients [49]. *POT1*, another shelterin gene, was recently reported as a melanoma predisposition gene [50,51]. These data might implicate an indirect role for *MACROD2* germline alterations in the composition of melanoma risk.

The duplication of *ANGPT1* at 8q23.1 highlights a gene that has an important role in vascular development and angiogenesis. Although *ANGPT1* has been described as frequently altered in many types of tumors, some studies did not identify *ANGPT1* expression changes during disease progression [52]. However, other study demonstrated that *ANGPT1* overexpression can facilitate the entry of tumor cells on circulation, and also metastasis [53]. These discrepant data suggest that *ANGPT1* should be deeply investigated in experimental approaches in order to evaluate if overexpression could be related to increased melanoma oncogenesis or progression.

One of the deletions here underscored encompasses *IDH1*, a cancer gene considered a strong genetic determinant for human gliomas [54–56]. In accordance to the hypothesis that *IDH1* haploinsufficiency could contribute for melanomagenesis, a study recently showed a role for *IDH1* downregulation in a skin cell model of tumor promotion after UVC irradiation treatment [57]. Furthermore, *IDH1* interacts with *TP53*, *CDH1*, *ATF4* and *HIF1A* genes in molecular pathways associated with melanocyte development and

pigmentation signaling, melanoma signaling and molecular mechanisms of cancer. The patient carrying the detected germline *IDH1* deletion presented with a history of excessive sun exposure, further corroborating the hint of *IDH1* deletion as part of a compound risk for melanoma predisposition.

Finally, we would like to highlight the detected germline duplication at 6p22.1 that encompasses one of the two human clusters of histone genes which are responsible for nucleosome structure of the chromatin and regulation of gene expression [58]. Recent works have revealed a complex interplay of epigenetic processes regulating gene expression in melanoma development and progression [59]. Alterations affecting genes from this histone core were already associated with several human malignancies [60–62], and are believed to deregulate the control of gene expression.

All of the copy number imbalances herein reported are rare germline variants not detected in a large control group of Brazilians; they are relatively large copy number changes, and

harbor coding genes. However, the challenge is to distinguish which of them are harmless private variants from those that could be causally related to the melanoma predisposition. Important limitations of this study were: phenotype segregation could not be performed for the familial cases; the lack of tumor material from patients, which prevented investigating the presence of the constitutive CNVs in neoplastic tissues, it also precluded expression analyses of the affected genes; and the small size of the cohort, possibly contributing for the nonrecurrence of the detected CNVs.

It may be an important clue the results of the *in silico* analysis which showed that, at least for part of the CNVs, the affected genes are associated with biological pathways relevant to skin cancer, particularly melanoma. Accordingly, the mining of the genomic data from TCGA [33,34] has pointed out that some of these genes are frequently amplified in melanoma samples, such as *ANGPT1* and the 6p22.1 cluster of histone genes.

EXECUTIVE SUMMARY

Background

- Germline mutations affecting known cancer predisposition genes account for <50% of the melanoma-prone families.
- Germline copy number changes of *bona fide* cancer genes are relevant as predisposition factors and, therefore, rare copy number variants (CNVs) may contribute to the unexplained hereditary cases of melanoma.

Patients & methods

- SNP array is a robust approach for investigating copy number changes, and was applied to identify rare germline CNVs in a cohort of 41 melanoma-prone patients.

Results

- The CNV analysis revealed ten rare CNVs covering 54 known genes in nine out of 41 patients, mostly duplications, and none of them recurrent.
- A major network was disclosed, mainly associated with cellular development, cellular growth and proliferation, and comprising nine out of the 54 genes (*ANGPT1*, *SFTPA1*, *TMEM14C*, *PDE5A*, *IDH1*, *MAD2L1*, *HIST1H1B*, *SFTPD* and *VLDLR*). These nine genes were distributed over eight of the ten CNVs.
- Four genes were found to be directly related to melanoma phenotype (*ANGPT1*, *IDH1*, *PDE5A* and *HIST1H1B*), while the remaining are indirectly linked through pathways such as control of cell cycle, melanin production and melanocytes differentiation, and angiogenesis.

Discussion

- Part of the genes encompassed by the rare CNVs were connected in a network enriched for cellular development, cellular growth and proliferation, and almost all CNVs carried at least one gene from this relevant network.
- The melanoma-prone patients carrying rare CNVs presented a decreased age of disease onset compared with the group of patients, and some of them exhibited an overall higher skin cancer predisposition.

Conclusion

- Rare germline CNVs may compose the genetic background of melanoma predisposition in this cohort.

Conclusion

In brief, our results have suggested that rare germline CNVs potentially add to the genetic risk for skin melanoma development. However, further studies in larger melanoma patient cohorts are warranted to clarify the relevance of the copy number variant genomic regions and genes here reported for melanoma susceptibility.

Supplementary data

To view the supplementary data that accompany this paper please visit the journal website at: www.futuremedicine.com/doi/full/10.2217/fon.16.22.

Acknowledgements

The authors are indebted to the patients and their families included in this study. They thank the Biobank of the AC Camargo Cancer Center for providing DNA samples.

References

Papers of special note have been highlighted as:

• of interest; •• of considerable interest

- 1 Swick JM, Maize JC. Molecular biology of melanoma. *J. Am. Acad. Dermatol.* 67(5), 1049–1054 (2012).
- 2 Miller AJ, Mihm MC. Melanoma. *N. Engl. J. Med.* 355(1), 51–65 (2006).
- 3 Ward KA, Lazovich D, Hordinsky MK. Germline melanoma susceptibility and prognostic genes: a review of the literature. *J. Am. Acad. Dermatol.* 67(5), 1055–1067 (2012).
- **Article relevant for melanoma predisposition.**
- 4 Hansen CB, Wadge LM, Lowstuter K, Boucher K, Leachman SA. Clinical germline genetic testing for melanoma. *Lancet Oncol.* 5(5), 314–319 (2004).
- 5 Marzuka-Alcalá A, Gabree MJ, Tsao H. Melanoma susceptibility genes and risk assessment. *Methods Mol. Biol.* 1102, 381–393 (2014).
- 6 Wiesner T, Obenauf AC, Murali R *et al.* Germline mutations in *BAP1* predispose to melanocytic tumors. *Nat. Genet.* 43(10), 1018–1021 (2011).
- 7 Yokoyama S, Woods SL, Boyle GM *et al.* A novel recurrent mutation in *MITF* predisposes to familial and sporadic melanoma. *Nature* 480(7375), 99–103 (2011).
- **This work reports the *MITF* gene as a melanoma susceptibility factor.**
- 8 Horn S, Figl A, Rachakonda PS *et al.* *TERT* promoter mutations in familial and sporadic

Financial & competing interests disclosure

This work was supported by grants from the National Institute of Science and Technology (2008/57887-9), FAPESP (2012/21932-6; 2013-07480-8) and CNPq (Universal 470446_2013-7). The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

Ethical conduct of research

The authors state that they have obtained appropriate institutional review board approval or have followed the principles outlined in the Declaration of Helsinki for all human or animal experimental investigations. In addition, for investigations involving human subjects, informed consent has been obtained from the participants involved.

melanoma. *Science* 339(6122), 959–961 (2013).

- **Reports *TERT* promoter mutations in familial melanoma patients and also detected a high frequency of *TERT* promoter mutations in the melanoma samples themselves.**
- 9 Sebat J, Lakshmi B, Troge J *et al.* Large-scale copy number polymorphism in the human genome. *Science* 305(5683), 525–528 (2004).
- 10 Redon R, Ishikawa S, Fitch KR *et al.* Global variation in copy number in the human genome. *Nature* 444(7118), 444–454 (2006).
- 11 Li W, Olivier M. Current analysis platforms and methods for detecting copy number variation. *Physiol. Genomics* 45(1), 1–16 (2013).
- 12 Krepischi-Santos AC, Vianna-Morgante AM, Jehee FS *et al.* Whole-genome array-CGH screening in undiagnosed syndromic patients: old syndromes revisited and new alterations. *Cytogenet. Genome Res.* 115(3–4), 254–261 (2006).
- 13 Shaw-Smith C, Pittman AM, Willatt L *et al.* Microdeletion encompassing *MAPT* at chromosome 17q21.3 is associated with developmental delay and learning disability. *Nat. Genet.* 38(9), 1032–1037 (2006).
- 14 Gonçalves A, Ewald IP, Sapienza M *et al.* Li-Fraumeni-like syndrome associated with a large *BRCA1* intragenic deletion. *BMC Cancer* 12(1), 237 (2012).
- 15 Yang XR, Brown K, Landi MT *et al.* Duplication of *CXC* chemokine genes on chromosome 4q13 in a melanoma-prone family. *Pigment Cell Melanoma Res.* 25(2), 243–247 (2012).
- **First work reporting a rare germline copy number variant (CNV; excluding *CDKN2A* deletions) as a mechanism to melanoma susceptibility in one melanoma-prone family.**
- 16 Krepischi AC, Pearson PL, Rosenberg C. Germline copy number variations and cancer predisposition. *Future Oncol.* 8(4), 441–450 (2012).
- **Review of the role of germline CNVs associated with cancer susceptibility.**
- 17 Krepischi AC, Achatz MI, Santos EM *et al.* Germline DNA copy number variation in familial and early-onset breast cancer. *Breast Cancer Res.* 14(1), R24 (2012).
- 18 Cappi C, Hounie AG, Mariani DB *et al.* An inherited small microdeletion at 15q13.3 in a patient with early-onset obsessive-compulsive disorder. *PLoS ONE* 9(10), e110198 (2014).
- 19 Fidalgo F, Gomes EE, Moredo Facure L *et al.* Association of melanoma with intraepithelial neoplasia of the pancreas in three patients. *Exp. Mol. Pathol.* 97(1), 144–147 (2014).
- **Reports rare germline CNVs identified in patients with melanoma and neoplasia of the pancreas.**
- 20 Silva AG, Krepischi AC, Pearson PL, Hainaut P, Rosenberg C, Achatz MI. The profile and contribution of rare germline copy number variants to cancer risk in Li-Fraumeni patients negative for *TP53* mutations. *Orphanet. J. Rare Dis.* 9, 63 (2014).

- 21 de ávila AL, Krepischi AC, Moredo LF *et al.* Germline *CDKN2A* mutations in Brazilian patients of hereditary cutaneous melanoma. *Fam. Cancer* 13(4), 645–649 (2014).
- 22 Prámio D, Aguiar T, Araújo É *et al.* Low frequency of germline *TERT* and *MITF* mutations in Brazilian melanoma-prone patients. *Hereditary Genet.* 3(3), 135 (2014).
- 23 Goldstein AM, Chan M, Harland M *et al.* Features associated with germline *CDKN2A* mutations: a GenoMEL study of melanoma-prone families from three continents. *J. Med. Genet.* 44(2), 99–106 (2007).
- A reference work on germline mutations associated with melanoma predisposition.
- 24 Leachman SA, Carucci J, Kohlmann W *et al.* Selection criteria for genetic assessment of patients with familial melanoma. *J. Am. Acad. Dermatol.* 61(4), 677.e671–677.e614 (2009).
- 25 ClinGen. <https://www.clinicalgenome.org>
- 26 Database of Genomic Variants. <http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>
- 27 Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* 25(4), 402–408 (2001).
- 28 Human (Homo sapiens) Genome Browser Gateway. <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>
- 29 COSMIC. www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic
- 30 Ingenuity®. www.ingenuity.com
- 31 VarElect. <http://varelect.genecards.org>
- 32 The Cancer Genome Atlas. <http://cancergenome.nih.gov/>
- 33 Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U *et al.* Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci. Signal.* 6(269), p11 (2013).
- 34 Cerami E, Gao J, Dogrusoz U *et al.* The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov.* 2(5), 401–404 (2012).
- 35 Newman S, Hermetz KE, Weckselblatt B, Rudd MK. Next-generation sequencing of duplication CNVs reveals that most are tandem and some create fusion genes at breakpoints. *Am. J. Hum. Genet.* 96(2), 208–220 (2015).
- 36 Feuk L, Marshall CR, Wintle RF, Scherer SW. Structural variants: changing the landscape of chromosomes and design of disease studies. *Hum. Mol. Genet.* 15, R57–R66 (2006).
- 37 Payne AS, Cornelius LA. The role of chemokines in melanoma tumor growth and metastasis. *J. Invest. Dermatol.* 118(6), 915–922 (2002).
- 38 Conrad DF, Pinto D, Redon R *et al.* Origins and functional impact of copy number variation in the human genome. *Nature* 464(7289), 704–712 (2010).
- 39 Silva AG, Rodrigues TC, Pearson PL, Rosenberg C, Krepischi ACV. Germline copy number variation contribution to cancer predisposition. *eLS* doi:10.1002/9780470015902.a0025028 (2013) (Epub ahead of print).
- 40 MacDonald JR, Ziman R, Yuen RK, Feuk L, Scherer SW. The Database of Genomic Variants: a curated collection of structural variation in the human genome. *Nucleic Acids Res.* 42, D986–D992 (2014).
- 41 Krepischi AC, Capelli LP, Silva AG *et al.* Large germline copy number variations as predisposing factor in childhood neoplasms. *Future Oncol.* 10(9), 1627–1633 (2014).
- 42 Murata T, Shimizu K, Watanabe Y, Morita H, Sekida M, Tagawa T. Expression and role of phosphodiesterase 5 in human malignant melanoma cell line. *Anticancer Res.* 30(2), 355–358 (2010).
- 43 Sarfati M, Mateo V, Baudet S *et al.* Sildenafil and vardenafil, types 5 and 6 phosphodiesterase inhibitors, induce caspase-dependent apoptosis of B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 101(1), 265–269 (2003).
- 44 Zhu B, Vemavarapu L, Thompson WJ, Strada SJ. Suppression of cyclic GMP-specific phosphodiesterase 5 promotes apoptosis and inhibits growth in HT29 cells. *J. Cell. Biochem.* 94(2), 336–350 (2005).
- 45 Tinsley HN, Gary BD, Keeton AB *et al.* Sulindac sulfide selectively inhibits growth and induces apoptosis of human breast tumor cells by phosphodiesterase 5 inhibition, elevation of cyclic GMP, and activation of protein kinase G. *Mol. Cancer Ther.* 8(12), 3331–3340 (2009).
- 46 Guo Y, Zhang X, Yang M *et al.* Functional evaluation of missense variations in the human *MAD1L1* and *MAD2L1* genes and their impact on susceptibility to lung cancer. *J. Med. Genet.* 47(9), 616–622 (2010).
- 47 Wang J, Duncan D, Shi Z, Zhang B. WEB-based GEne SeT AnaLysis Toolkit (WebGestalt): update 2013. *Nucleic Acids Res.* 41, W77–W83 (2013).
- 48 Zhang B, Kirov S, Snoddy J. WebGestalt: an integrated system for exploring gene sets in various biological contexts. *Nucleic Acids Res.* 33, W741–W748 (2005).
- 49 Bodelon C, Pfeiffer RM, Bollati V *et al.* On the interplay of telomeres, nevi and the risk of melanoma. *PLoS ONE* 7(12), e52466 (2012).
- 50 Shi J, Yang XR, Ballew B *et al.* Rare missense variants in *POT1* predispose to familial cutaneous malignant melanoma. *Nat. Genet.* 46(5), 482–486 (2014).
- 51 Robles-Espinoza CD, Harland M, Ramsay AJ *et al.* *POT1* loss-of-function variants predispose to familial melanoma. *Nat. Genet.* 46(5), 478–481 (2014).
- 52 Gardizi M, Kurschat C, Riese A *et al.* A decreased ratio between serum levels of the antagonistic angiopoietins 1 and 2 indicates tumour progression of malignant melanoma. *Arch. Dermatol. Res.* 304(5), 397–400 (2012).
- 53 Holopainen T, Huang H, Chen C *et al.* Angiopoietin-1 overexpression modulates vascular endothelium to facilitate tumor cell dissemination and metastasis establishment. *Cancer Res.* 69(11), 4656–4664 (2009).
- 54 Yan H, Parsons DW, Jin G *et al.* *IDH1* and *IDH2* mutations in gliomas. *N. Engl. J. Med.* 360(8), 765–773 (2009).
- 55 Sanson M, Marie Y, Paris S *et al.* Isocitrate dehydrogenase 1 codon 132 mutation is an important prognostic biomarker in gliomas. *J. Clin. Oncol.* 27(25), 4150–4154 (2009).
- 56 Birner P, Pusch S, Christov C *et al.* Mutant *IDH1* inhibits PI3K/Akt signaling in human glioma. *Cancer* 120(16), 2440–2447 (2014).
- 57 Robbins D, Wittwer JA, Codarin S *et al.* Isocitrate dehydrogenase 1 is downregulated during early skin tumorigenesis which can be inhibited by overexpression of manganese superoxide dismutase. *Cancer Sci.* 103(8), 1429–1433 (2012).
- 58 Harshman SW, Young NL, Parthun MR, Freitas MA. H1 histones: current perspectives and challenges. *Nucleic Acids Res.* 41(21), 9593–9609 (2013).
- 59 Sarkar D, Leung EY, Baguley BC, Finlay GJ, Askarian-Amiri ME. Epigenetic regulation in human melanoma: past and future. *Epigenetics* 10(2), 103–121 (2015).
- 60 Payne SR, Serth J, Schostak M *et al.* DNA methylation biomarkers of prostate cancer: confirmation of candidates and evidence urine is the most sensitive body fluid for

non-invasive detection. *Prostate* 69(12), 1257–1269 (2009).

61 Liao YP, Chen LY, Huang RL *et al.* Hypomethylation signature of tumor-

initiating cells predicts poor prognosis of ovarian cancer patients. *Hum. Mol. Genet.* 23(7), 1894–1906 (2013).

62 Hechtman JF, Beasley MB, Kinoshita Y, Ko HM, Hao K, Burstein DE. Promyelocytic

leukemia zinc finger and histone H1.5 differentially stain low- and high-grade pulmonary neuroendocrine tumors: a pilot immunohistochemical study. *Hum. Pathol.* 44(7), 1400–1405 (2013).

4.1.2 Melanoma familiar e melanomas múltiplos

A investigação de CNVs germinativas foi também realizada no genoma de 41 indivíduos não aparentados com critérios para melanoma hereditário. Detectamos em 9 pacientes deste grupo (representando 22% de nossa coorte) um total de 10 CNVs germinativas raras, em segmentos apresentando pouca ou nenhuma anotação no *Database of Genomic Variants*.

O grupo de CNVs é composto por 7 duplicações e 3 deleções: 8 pacientes apresentaram diferentes CNVs raras de tamanho >100 Kb, e um paciente era portador de duas CNVs contíguas (uma deleção e uma duplicação) no cromossomo 10. Dentre os 9 probandos portadores de CNVs raras, 6 representam casos de melanoma familiar e 3 são pacientes afetados por melanomas múltiplos. A confirmação dessas CNVs raras foi realizada utilizando a técnica qPCR.

Os dados resumidos acima estão apresentados em detalhes em formato de artigo científico e foram publicados na revista *Future Oncology* (FIDALGO et al. 2016).



Association of melanoma with intraepithelial neoplasia of the pancreas in three patients



Felipe Fidalgo^a, Elimar Elias Gomes^b, Luciana Moredo Facure^b, Felipe Carneiro Da Silva^a, Dirce Maria Carraro^a, Bianca Costa Soares de Sá^b, João Pedreira Duprat Neto^b, Ana Cristina Victorino Krepsichi^{a,c,*}

^a International Research Center, AC Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil

^b Department of Skin Cancer, AC Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil

^c Department of Genetics and Evolutionary Biology, University of São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 June 2014

Available online 28 June 2014

Keywords:

Germline copy number variation

CNV

Melanoma

Pancreatic cancer

Intraepithelial neoplasia of pancreas

ABSTRACT

Melanoma and pancreatic cancer are two low frequency types of cancer. In this study, three patients who developed both melanoma and intraepithelial neoplasia of the pancreas were tested for *CDKN2A* mutations and deletions, and investigated for rare germline copy number variations (CNVs). The three patients were negative for *CDKN2A* point mutations and intragenic deletions. One of these patients carried two large (>300 kb) germline CNVs, both genomic duplications affecting coding sequences that are not copy number variable in the population. A second patient exhibited loss of the entire Y chromosome, an event probably coincidental related to his advanced age (79 years-old). Our data pinpoint that rare germline CNVs harboring genes can contribute to the cancer predisposition of melanoma and intraepithelial neoplasia of the pancreas.

© 2014 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-SA license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>).

Introduction

Pancreatic cancer has one of the highest death rates among all cancer types. The relative 5-year survival rate of pancreatic cancer in the USA was estimated in 6% (<http://seer.cancer.gov/>), primarily due to the late detection of the disease and the lack of effective treatment (Ma and Jemal, 2013).

It is already known that familial history of pancreatic cancer is an important risk factor associated with this tumor development (Permeth-Wey and Egan, 2009). Nevertheless, only 20% of all familial pancreatic cancer has a known genetic etiology. Mutations in some specific genes were already reported increasing the susceptibility to pancreatic cancer, such as *BRCA1*, *BRCA2*, *ATM*, *STK11*, *PRSS1*, and *PALB2* (Jones et al., 2009; Solomon et al., 2012). In addition, some previous studies have established that familial history of melanoma is a risk factor to the development of pancreatic cancer (Rustgi, 2014; Zavoral et al., 2011). Melanoma exhibits a low but increasing incidence (Jemal et al., 2006), and although accounting for only 4% of all skin cancer cases, melanoma is responsible for approximately 75% of all deaths caused by cutaneous neoplasias (Schinke et al., 2010). Among all melanoma cases, approximately 10% occur in a familial context, and up to 40% of the familial melanoma are caused by mutations affecting the *CDKN2A* gene, mainly the p16 variant (Pho et al., 2006). *CDKN2A* mutation is

associated with the occurrence of pancreatic cancer in familial melanoma with a cumulative risk of up to 20% by age 75 (Rustgi, 2014). Few genes were associated with the concomitant development of melanoma and pancreatic cancer in the same patient, mainly the aforementioned *CDKN2A*, and also *BRCA1* (Bartsch et al., 2010; Solomon et al., 2012).

There are three precursor lesions giving rise to pancreatic cancer that includes pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN), intraductal papillary mucinous neoplasms (IPMNs) and mucinous cystic neoplasms (MCNs), each of them arising in association with distinct genetic alterations (Macgregor-Das and Iacobuzio-Donahue, 2013).

Pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN) can be divided in three grades based on their degree of morphologic atypia and mucin output. The entire spectrum – PanIN-1, PanIN-2, PanIN-3 – represents a gradual neoplastic progression and cumulative alterations on gene expression, including somatic mutations on *KRAS2*, *TP53*, *CDKN2A*, and *MADH4/SMAD4/DPC4* (Biankin et al., 2003; Macgregor-Das and Iacobuzio-Donahue, 2013; Maire et al., 2013). PanINs are the most frequent pancreatic cancer precursor, even though it may arise from any of the three precursor lesions described above (Macgregor-Das and Iacobuzio-Donahue, 2013). In preinvasive IPMN, mutations in *KRAS*, *TP53*, *BRAF*, and in the serine/threonine kinase *STK11/LKB1* have been reported (Sahin et al., 2003; Schönleben et al., 2007). Mutations in *KRAS* and *TP53* have been also noted in higher-grade lesions of MCNs.

Germline copy number variations (CNVs) are gains and losses of large genomic segments composing with other variants the genetic background of human populations (Redon et al., 2006; Sebat et al., 2004). CNVs encompass approximately 15% of the human genome,

* Corresponding author at: Department of Genetics and Evolutionary Biology, University of São Paulo, Brazil.

E-mail address: ana.krepischi@gmail.com (A.C.V. Krepsichi).

and mainly affect a subset of genes involved in immunity, interaction to environment and infection (Li and Olivier, 2013). This type of genomic variants can modulate the phenotype and therefore contributes to the genetic individuality (Li and Olivier, 2013). Although most of the CNVs are not pathogenic, several were causally related to congenital diseases, and some were already associated with susceptibility to cancer, including melanoma and pancreatic cancer (Al-Sukhni et al., 2012; Gonçalves et al., 2012; Krepischki et al., 2012a, 2012b; Krepischki-Santos et al., 2006; Lucito et al., 2007; Shaw-Smith et al., 2006; Yang et al., 2012). Therefore, rare germline CNVs can harbor genes composing the genetic susceptibility to cancer. Genomic profiles of germline CNVs of three melanoma patients who also developed intraepithelial neoplasia of the pancreas were assessed in order to find rare variants possibly related to the phenotype.

Materials and methods

Study approval and patient samples

The patients were ascertained at the Skin Cancer Department of the A. C. Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil (ACCCC). This is a retrospective study approved by the local Ethics and Research Committee of the Institution (#1728/12), and signed informed consents were obtained from the patients. This patient group comprised 3 unrelated probands who developed both cutaneous melanoma and intraepithelial neoplasia of the pancreas. DNA samples were extracted from peripheral leukocytes following standard procedures.

CDKN2A and CDK4 sequencing

DNA sequencing was conducted at the Laboratory of Genomics and Molecular Biology (ACCCC). Direct sequencing of the *CDKN2A* (p16^{INK4a} and p14^{ARF}) and the *CDK4* genes was performed on DNA samples extracted from peripheral blood (primer sequences available upon request). Variants of unknown clinical significance were investigated in dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>) and 1000 Genomes (<http://www.1000genomes.org/>).

DNA copy number variation (CNV) assessment

We performed the evaluation of CNVs using the CytoSNP 850K BeadChip (Illumina) which contains 850,000 SNP probes covering the whole-genome with enriched coverage for 3262 well-known genes of constitutional and cancer diseases. Labeling, hybridization, and washing procedures followed the manufacturer's instructions. Microarray slides were scanned using the iScan System (Illumina), and generated gtc files were loaded on the BlueFuse Multi Software v3.2 (BlueGnome) to evaluate experimental quality and CNV calling. Alterations had to encompass at least five consecutive probes with aberrant log₂ values with a minimum size of 100 kb. The detected variants were compared to the CNVs' panel of normal populations reported in the Database of

Genomic Variants (DGV; <http://projects.tcag.ca/variation/>; freeze January 2014), and common CNVs were disregarded. Variants presenting with frequencies <0.1% among the control individuals, and harboring genes (thereafter referred as rare CNVs) were selected for further validation. Gene annotation was performed using the University of California Santa Cruz Genome Browser (UCSC; <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>) and the Catalog of Somatic Mutations (COSMIC; <http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/>).

Copy number validation by real-time quantitative PCR (qPCR)

In order to validate two rare CNVs, qPCR was performed using the SYBR Green system (Applied Biosystems) on a 7500 System apparatus (Applied Biosystems) with a reference DNA (Promega) as control for copy number calibration. We designed probes covering coding sequences of one of the genes contained in each CNV (Supplementary Table S1). Values were normalized based on data from the *GAPDH* (12p13) e *HPRT* (Xq26.2) genes as described by Torrezan et al. (2012). Triplicates were analyzed using the comparative 2^{-ΔΔC_t} cycle threshold method (Livak and Schmittgen, 2001). Values in the range of 0.8–1.2 indicated two copies, <0.6 indicated copy number loss, and >1.4 was considered a gain.

Results

Clinical description of the three patients can be found in Table 1. These patients were screened for point mutations affecting the coding sequence, promoter or splice junctions of the *CDKN2A* gene, and no pathogenic mutations were detected. Additionally, we investigated the presence of *CDKN2A* deletions using the 850K SNP-array data, and copy number alterations affecting the *CDKN2A* genomic region were not detected.

Two rare germline CNVs validated by qPCR were detected in one of the patients: a 616 kb duplication at 2p12 encompassing the *CTNNA2* and *MIR4264* genes, and a 368 kb duplication at 5q35.3 containing the *GRM6*, *ADAMTS2*, *ZNF879* and *ZNF354C* genes. Genomic mapping of the variants are detailed in Table 2. These duplications occurred in genomic segments with few or none reports in the Database of Genomic Variants (Fig. 1).

Additionally, one patient who was 79 years-old at diagnosis was found to exhibit loss of the entire chromosome Y in leukocytes.

Discussion

Germline copy number alterations are already known to contribute to cancer susceptibility, including melanoma and pancreatic cancer (Al-Sukhni et al., 2012; Krepischki et al., 2012b; Lucito et al., 2007; Silva et al., 2012; Yang et al., 2012). A recent study identified a 4q13 germline duplication in one melanoma family (Yang et al., 2012). Concerning pancreatic cancer, three CNV studies provided candidate genes to

Table 1
Description of clinicopathologic features of the 3 patients regarding to melanoma and pancreatic cancer status.

Patient	Rare germline CNV	Actual age/gender	Melanoma clinicopathologic features (diagnostic age, location, histopathology)	Melanoma status disease	FMS	Pancreatic cancer clinicopathologic features (diagnostic age, symptoms, histopathology)	Pancreatic cancer status disease	FPCS
1	0	69 y/M	57 y, trunk, superficial spreading melanoma, B = 0.5 mm	AWD	No	68 y, asymptomatic, well-differentiated neuroendocrine tumor and IPMN	AWD	No
2	Duplications at 2p12 and 5q35.3	65 y/M	58 y, trunk, superficial spreading melanoma, B = 0.45 mm, CL II	AWD	No	64 y, abdominal pain, microcystic serous cystadenoma and PanIN-1	AWD	No
3	Chr. Y loss	85 y/M	78 y, trunk, lentigo maligno melanoma, B = 3.2 mm, CL IV, BRAF negative	Local and linfonodal metastatic	No	84 y, asymptomatic, invasive mucinous adenocarcinoma and IPMN	AWD	No

FMS – Familial Melanoma Syndrome; FPCS – Familial Pancreatic Cancer Syndrome; B – Breslow thickness; CL – Clark level, PanIN-1 – low grade pancreatic intraepithelial neoplasia; IPMN – intraductal papillary mucinous carcinoma; AWD – alive without disease.

Table 2
Description of two rare germline copy number variations (CNVs) identified in one patient, with respective genomic positions (GRCh37), ISCN 2013 description, size, type of copy number event, and affected genes.

Cytoband	Start position	ISCN 2013	Size (kb)	CNV type	Genes affected ^a
2p12	79,539,758	arr 2p12(79,539,758-80,156,246)x3	616	Duplication	<i>CTNNA2</i> ^a , <i>mir4264</i>
5q35.3	178,413,947	arr 5q35.3(178,413,947-178,782,813)x3	368	Duplication	<i>GRM6</i> ^a , <i>ADAMTS2</i> , <i>ZNF879</i> , <i>ZNF354C</i>

^a Genes selected for validation using qPCR.

pancreatic cancer susceptibility (Al-Sukhni et al., 2012; Huang et al., 2012; Lucito et al., 2007).

Although loss of Y chromosome has been associated with some tumors such as lymphocytic leukemia (Chapiro et al., 2014), it was already described in low percentage of men after the seventies (Guttenbach et al., 1995). The two detected CNVs were duplications, one of them affecting a 2p12 segment sizing 616 kb that harbors the *CTNNA2* and *MIR4264* genes. *CTNNA2* acts at cadherin adhesion that regulates cell–cell adhesion and differentiation (Gene Cards – www.genecards.org), and it was recently described as a tumor suppressor gene in laryngeal cancer (Fanjul-Fernández et al., 2013). Accordingly, *in silico* analysis using String

(<http://string-db.org>) puts this gene in cancer pathways. The other detected rare CNV is a 5q35.3 duplication of 368 kb that harbors the *GRM6*, *ADAMTS2*, *ZNF879* and *ZNF354C* genes. The *GRM6* gene was recently seen hypermethylated in renal cell carcinomas (Arai et al., 2012); *ADAMTS2* acts as a metalloproteinase protein already reported as altered in squamous cell carcinoma (Carinci et al., 2005). In addition, *ADAMTS2* was associated with a 2–3 fold increase of the risk for malignant pleural mesothelioma development (Matullo et al., 2013).

Although we cannot exclude that the occurrence of rare CNVs can be a coincidental finding, our data on rare germline CNVs highlighted genes that, in case of being dosage sensitive, could add to the genetic

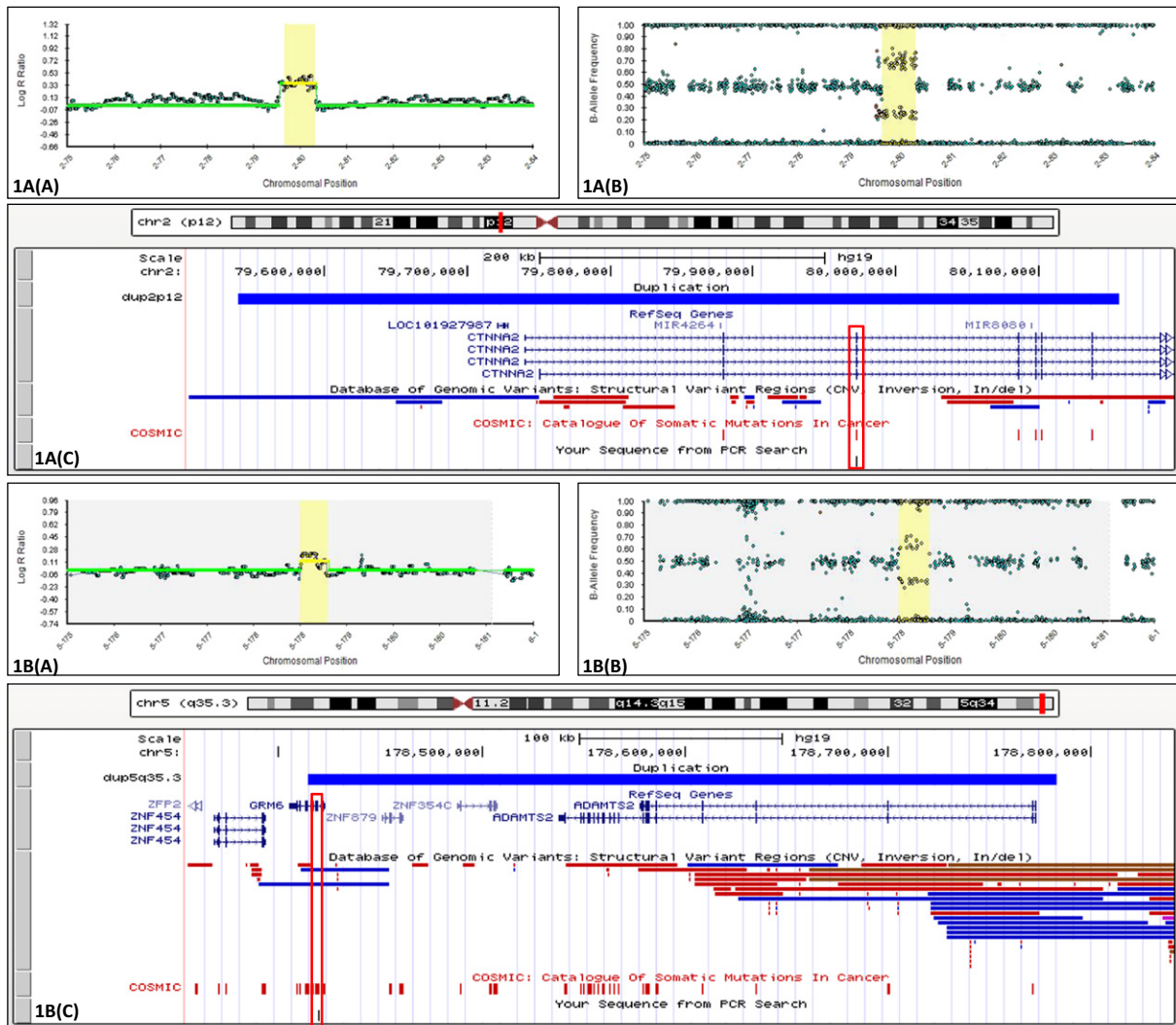


Fig. 1. A: Rare CNV (duplication) affecting a 616 kb genomic region at 2p12 detected by SNP-array in a melanoma/pancreatic cancer patient. (A) Probes above the baseline 0 of the Log-Ratio representing the duplicated segment at 2p12 are highlighted in yellow. (B) Plot of the B-allele frequency exhibiting the pattern of the 2p12 duplication highlighted in yellow. (C) The affected genomic segment at 2p12 seen by the UCSC genome browser: the region encompasses two genes, *CTNNA2* and *MIR4264*, and the sequence used in the qPCR assay is marked by a red box. B: Rare CNV (duplication) affecting a 368 kb genomic region at 5q35.3 detected by SNP-arrays in a melanoma/pancreatic cancer patient. (A) Probes above the baseline 0 of the Log-Ratio representing the 5q35.3 duplication highlighted in yellow. (B) Plot of the B-allele frequency presenting a pattern of the 5q35.3 duplication highlighted in yellow. (C) The affected genomic segment at 5q35.3 seen by the UCSC genome browser: the region encompasses four genes, *GRM6*, *ADAMTS2*, *ZNF879* and *ZNF354C*, and the sequence used in the qPCR assay is marked by a red box.

basis of the cancer predisposition of melanoma associated with a pancreatic neoplasia.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexmp.2014.06.013>.

Disclosure/conflict of interest

The authors have no conflict of interest to declare.

Acknowledgments

This work was supported by the National Institute of Science and Technology in Oncogenomics (Grant 08/57887-9) and FAPESP (Grants 2012/21932-6 and 2013/07480-8).

References

- Al-Sukhni, W., et al., 2012. Identification of germline genomic copy number variation in familial pancreatic cancer. *Hum. Genet.* 131, 1481–1494.
- Arai, E., et al., 2012. Single-CpG-resolution methylome analysis identifies clinicopathologically aggressive CpG island methylator phenotype clear cell renal cell carcinomas. *Carcinogenesis* 33, 1487–1493.
- Bartsch, D.K., et al., 2010. Clinical and genetic analysis of 18 pancreatic carcinoma/melanoma-prone families. *Clin. Genet.* 77, 333–341.
- Biankin, A.V., et al., 2003. Molecular pathogenesis of precursor lesions of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pathology* 35, 14–24.
- Carinci, F., et al., 2005. Potential markers of tongue tumor progression selected by cDNA microarray. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 18, 513–524.
- Chapiro, E., et al., 2014. Sex chromosome loss may represent a disease-associated clonal population in chronic lymphocytic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 53, 240–247.
- Fanjul-Fernández, M., et al., 2013. Cell–cell adhesion genes CTNNA2 and CTNNA3 are tumour suppressors frequently mutated in laryngeal carcinomas. *Nat. Commun.* 4, 2531.
- Gonçalves, A., et al., 2012. Li-Fraumeni-like syndrome associated with a large BRCA1 intragenic deletion. *BMC Cancer* 12, 237.
- Guttenbach, M., et al., 1995. Sex chromosome loss and aging: in situ hybridization studies on human interphase nuclei. *Am. J. Hum. Genet.* 57, 1143–1150.
- Huang, L., et al., 2012. Copy number variation at 6q13 functions as a long-range regulator and is associated with pancreatic cancer risk. *Carcinogenesis* 33, 94–100.
- Jemal, A., et al., 2006. Cancer statistics, 2006. *CA Cancer J. Clin.* 56, 106–130.
- Jones, S., et al., 2009. Exomic sequencing identifies PALB2 as a pancreatic cancer susceptibility gene. *Science* 324, 217.
- Krepischi, A.C., et al., 2012a. Germline DNA copy number variation in familial and early-onset breast cancer. *Breast Cancer Res.* 14, R24.
- Krepischi, A.C., et al., 2012b. Germline copy number variations and cancer predisposition. *Future Oncol.* 8, 441–450.
- Krepischi-Santos, A.C., et al., 2006. Whole-genome array-CGH screening in undiagnosed syndromic patients: old syndromes revisited and new alterations. *Cytogenet. Genome Res.* 115, 254–261.
- Li, W., Olivier, M., 2013. Current analysis platforms and methods for detecting copy number variation. *Physiol. Genomics* 45, 1–16.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(−Delta Delta C(T))} method. *Methods* 25, 402–408.
- Lucito, R., et al., 2007. Copy-number variants in patients with a strong family history of pancreatic cancer. *Cancer Biol. Ther.* 6, 1592–1599.
- Ma, J., Jemal, A., 2013. The rise and fall of cancer mortality in the USA: why does pancreatic cancer not follow the trend? *Future Oncol.* 9, 917–919.
- Macgregor-Das, A.M., Iacobuzio-Donahue, C.A., 2013. Molecular pathways in pancreatic carcinogenesis. *J. Surg. Oncol.* 107, 8–14.
- Maire, F., et al., 2013. Pancreatic intraepithelial neoplasia in patients with intraductal papillary mucinous neoplasms: the interest of endoscopic ultrasonography. *Pancreas* 42, 1262–1266.
- Matullo, G., et al., 2013. Genetic variants associated with increased risk of malignant pleural mesothelioma: a genome-wide association study. *PLoS One* 8, e61253.
- Permeth-Wey, J., Egan, K.M., 2009. Family history is a significant risk factor for pancreatic cancer: results from a systematic review and meta-analysis. *Fam. Cancer* 8, 109–117.
- Pho, L., et al., 2006. Melanoma genetics: a review of genetic factors and clinical phenotypes in familial melanoma. *Curr. Opin. Oncol.* 18, 173–179.
- Redon, R., et al., 2006. Global variation in copy number in the human genome. *Nature* 444, 444–454.
- Rustgi, A.K., 2014. Familial pancreatic cancer: genetic advances. *Genes Dev.* 28, 1–7.
- Sahin, F., et al., 2003. Loss of Stk11/Lkb1 expression in pancreatic and biliary neoplasms. *Mod. Pathol.* 16, 686–691.
- Schinke, C., et al., 2010. Aberrant DNA methylation in malignant melanoma. *Melanoma Res.* 20, 253–265.
- Schönleben, F., et al., 2007. BRAF and KRAS gene mutations in intraductal papillary mucinous neoplasm/carcinoma (IPMN/IPMC) of the pancreas. *Cancer Lett.* 249, 242–248.
- Sebat, J., et al., 2004. Large-scale copy number polymorphism in the human genome. *Science* 305, 525–528.
- Shaw-Smith, C., et al., 2006. Microdeletion encompassing MAPT at chromosome 17q21.3 is associated with developmental delay and learning disability. *Nat. Genet.* 38, 1032–1037.
- Silva, A.G., et al., 2012. Li-Fraumeni-like syndrome associated with a large BRCA1 intragenic deletion. *BMC Cancer* 12, 237.
- Solomon, S., et al., 2012. Inherited pancreatic cancer syndromes. *Cancer J.* 18, 485–491.
- Torrezan, G.T., et al., 2012. A novel SYBR-based duplex qPCR for the detection of gene dosage: detection of an APC large deletion in a familial adenomatous polyposis patient with an unusual phenotype. *BMC Med. Genet.* 13, 55.
- Yang, X.R., et al., 2012. Duplication of CXC chemokine genes on chromosome 4q13 in a melanoma-prone family. *Pigment Cell Melanoma Res.* 25, 243–247.
- Zavoral, M., et al., 2011. Molecular biology of pancreatic cancer. *World J. Gastroenterol.* 17, 2897–2908.

5 RESULTADOS – SEQUENCIAMENTO DE EXOMA

A fim de identificar novos genes de suscetibilidade ao melanoma, realizamos o sequenciamento de exoma de 10 amostras de pacientes de melanoma pertencentes a 5 famílias não relacionadas (2 afetados de cada família), sem mutação nos genes *CDKN2A*, *CDK4*, *MITF* e promotor de *TERT* (DE ÁVILA et al. 2014; PRAMIO et al. 2014). O sequenciamento de exoma foi realizado no Laboratório de Genômica e Biologia Molecular coordenado pela Dra. Dirce M. Carraro, com o auxílio da Dra. Bruna Barros. O quadro a seguir apresenta os dados clínicos dos pacientes incluídos nessa parte do estudo (Quadro 4).

Quadro 4 - Características clínicas dos 10 pacientes selecionados para o sequenciamento de exoma.

Pacientes	Gênero*	Idade (diagnóstico)	Nº de melanomas	Parentesco	Outro câncer
8148 (família 1)	F	50	1	Probando	Não
8719 (família 1)	M	65	4	Irmão	próstata
8422 (família 2)	F	30	1	Probando	Não
8421 (família 2)	F	24	3	Filha	Não
9034 (família 3)	F	51	1	Probando	Não
9035 (família 3)	F	46	1	Irmã	Não
10183 (família 4)	F	44	1	Probando	Não
10184 (família 4)	M	18	1	Filho	Não
10855 (família 5)	M	39	1	Probando	Não
10858 (família 5)	F	35	2	Mãe	n/a ¹

*F – feminino, M – masculino; ¹n/a: dado não disponível.

Após a fragmentação das amostras de DNA, os fragmentos foram analisados em equipamento BioAnalyzer (Agilent Technologies). A **Figura 7** mostra o

resultado de fragmentação de seis dessas amostras; o pico obtido indica que a maioria dos fragmentos genômicos dessas amostras encontrava-se na faixa adequada (100-300 pb). Todas as amostras obtiveram um padrão de fragmentação desejável (com pico ± 150 pb).

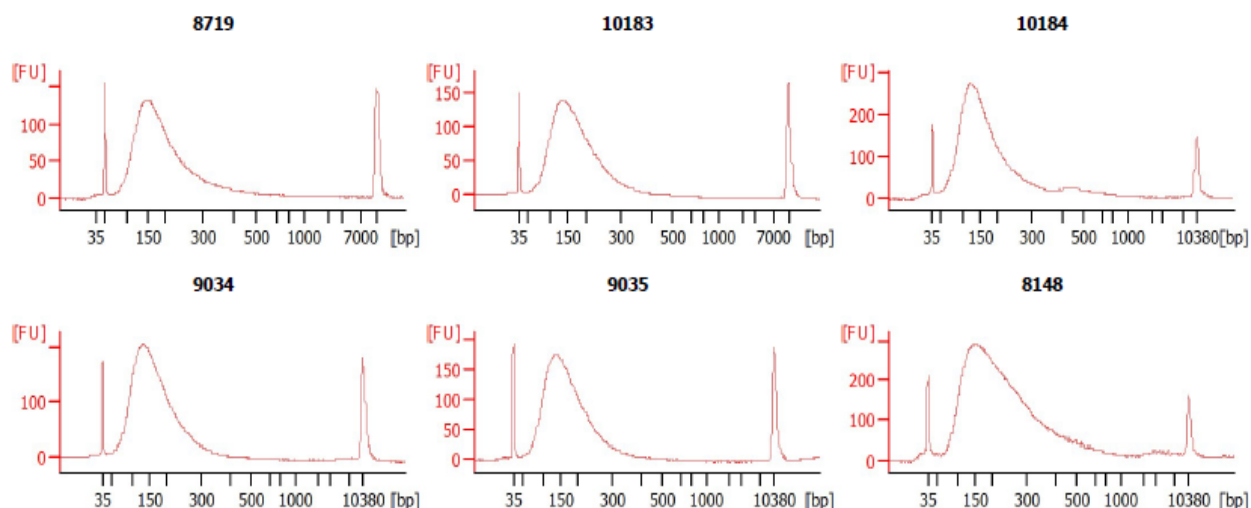


Figura 7 - Gráfico obtido a partir de dados de eletroforese em BioAnalyzer, mostrando o resultado da fragmentação de seis amostras de DNA, com pico entre 100-300pb, tamanho ideal dos fragmentos para nosso protocolo.

Após a fragmentação, foi realizada a ligação dos adaptadores listados abaixo, com sua sequência de identificação (Tabela 4). A adição dos adaptadores serve para posterior identificação de cada amostra pelo software do próprio sequenciador Ion Proton. O Quadro 5 descreve o número dos adaptadores utilizados e a sequência de identificação de cada um.

Quadro 5 - Sequência dos adaptadores ligados a cada amostra.

Amostra	Adaptadores	Sequência dos adaptadores
8421	10	CTGACCGAAC
8422	11	TCCTCGAATC
10855	12	TAGGTGGTTC
10858	13	TCTAACGGAC
8719	17	TCTATTCGTC
10183	18	AGGCAATTGC
10184	19	TTAGTCGGAC
9034	20	CAGATCCATC
9035	21	TCGCAATTAC
8148	22	TTCGAGACGC

O sequenciamento foi realizado em duas etapas. Na primeira delas, foi sequenciado um par de probandos por chip (*Ion PI™ Chip v3*). Na segunda etapa, para enriquecer a cobertura dos exomas (aumentar o número de reads – cada sequência obtida é chamada de *read*), as dez amostras foram colocadas em um mesmo chip e sequenciadas. Os dados de todas as corridas foram processados pela equipe de bioinformática, que realizou a junção dos dados referentes a cada amostra (arquivos BAM) e, em seguida, os dados foram alinhados com o genoma de referência para realizar a chamada de variantes (geração de arquivos vcf).

Todas as amostras mostraram resultados satisfatórios de sequenciamento, com parâmetros de qualidade bons, segundo relatório gerado pelo software do próprio sequenciador. O rendimento de ISP por poço do chip foi de no mínimo 87%, taxa considerada satisfatória, que indica que em 87% do chip havia amostra a ser sequenciada (Figura 8).

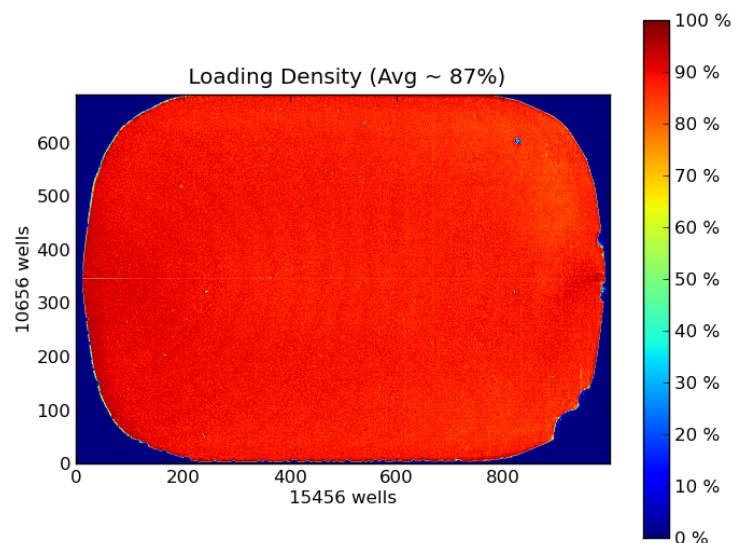


Figura 8 - Exemplo de imagem gerada no Ion Proton Sequencer mostrando a porcentagem (87% - escala à direita) de poços do chip que estavam preenchidos com ISPs, contendo fragmentos que foram sequenciados.

O tamanho dos fragmentos sequenciados também foi adequado com perfil esperado de um pico definido entre 100 – 200 pb. A média e mediana do tamanho dos fragmentos de todas as corridas foi de 127 pb e 164 pb, respectivamente. A Figura 9 apresenta um gráfico de uma das corridas de sequenciamento e a distribuição do tamanho dos fragmentos sequenciados. Alguns fragmentos estavam, possivelmente, com baixa qualidade, fazendo com que os dados das regiões cobertas por esses fragmentos fossem excluídos pelo próprio software do equipamento.

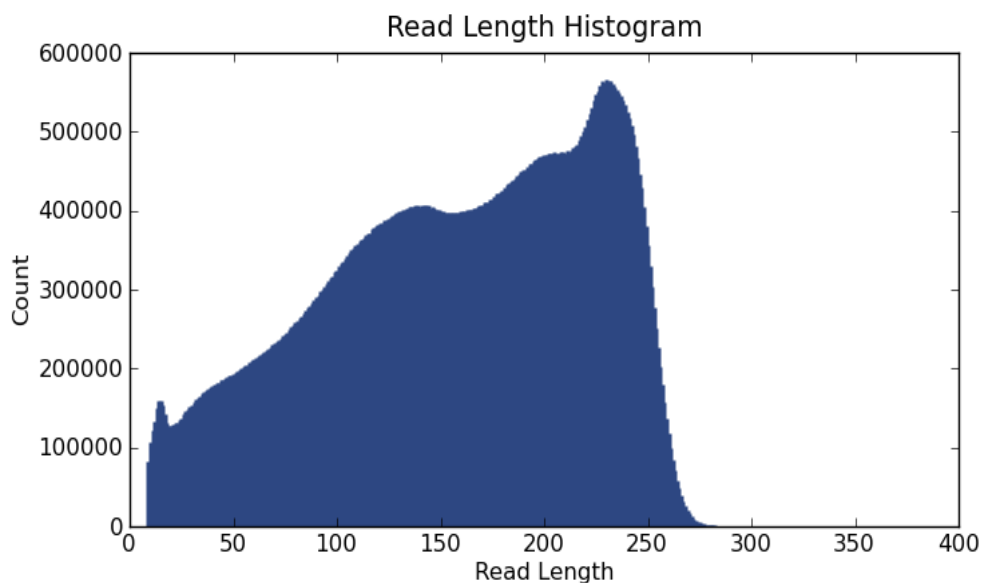


Figura 9 - O gráfico mostra o histograma de distribuição do tamanho dos fragmentos que foram sequenciados, evidenciando que a maioria deles tinha entre 150 e 250 pb.

Foram sequenciados 9,12 Gb por corrida (média) e 92,6% destas sequências foram alinhadas contra o genoma de referência. A Figura 10 ilustra a porcentagem de *reads* que foram alinhadas contra o genoma de referência em um dos sequenciamentos. Adicionalmente, 86% de todas as bases obtiveram uma cobertura mínima de 20x, em média.

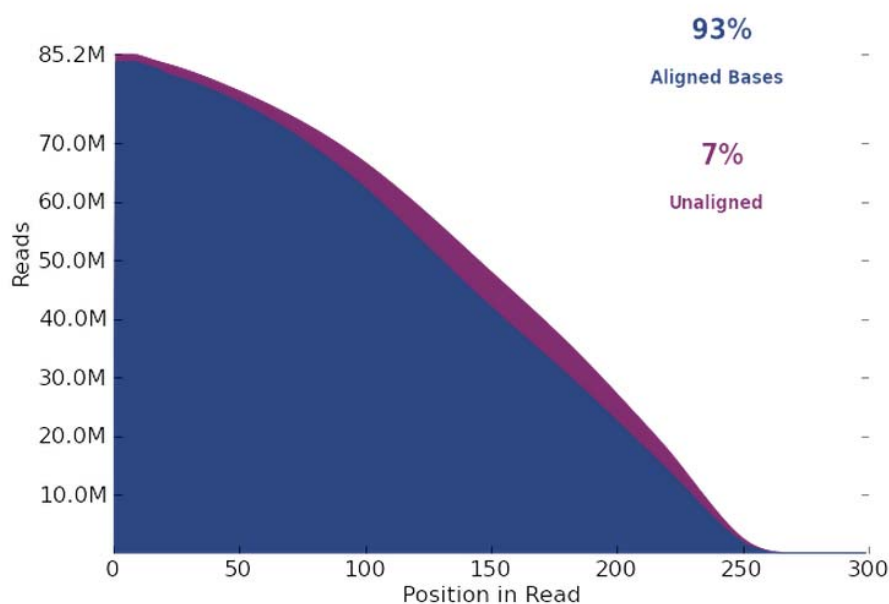


Figura 10 - O gráfico mostra a porcentagem de *reads* que foram alinhadas corretamente ao genoma de referência (93% - azul) e as *reads* não alinhadas (7% - roxo), distribuição considerada satisfatória.

A porcentagem de “*reads on target*” representa a eficiência de captura de fragmentos-alvo (sequências codificantes ou éxons) na construção da biblioteca, que é proporcional à quantidade desses fragmentos que são sequenciados. “*Reads off target*” são fragmentos que não mapearam ou que mapearam fora dos alvos (éxons) almejados.

A tabela abaixo apresenta o total de *reads* sequenciado por amostra, a quantidade e porcentagem de *reads on target*, porcentagem de *reads off targets* e a cobertura média das *reads* de cada amostra.

Tabela 1 - Descrição dos dados de sequenciamento de exoma de cada amostra de DNA genômico de 10 pacientes de melanoma hereditário: uma par de indivíduos afetados de cada família.

Amostra	Total de reads (fragmento)	Bases on targets (bases)	% Reads on targets	% Reads off targets	% Targets coverage >10x	% Targets coverage >20x	Cobertura média
8421	39.710.744	2.559.312.287	53,79	46,21	93,04	82,57	55,39
8422	47.986.371	3.142.267.120	54,58	45,42	95,09	89,67	68,00
8719	53.184.316	2.517.483.082	49,15	50,85	93,29	83,19	54,48
8148	37.303.632	3.640.221.065	45,78	54,22	94,90	89,22	78,78
9034	44.400.410	2.837.344.562	51,43	48,57	94,15	86,21	61,40
9035	45.645.297	2.732.761.051	49,90	50,10	94,45	86,72	59,14
10855	43.973.007	2.436.967.909	54,39	45,61	90,83	77,46	52,74
10858	57.279.052	3.412.222.401	53,13	46,87	95,15	90,53	73,84
10183	50.555.546	3.489.876.328	52,76	47,24	94,81	89,67	75,52
10184	38.954.087	2.267.137.529	51,04	48,96	93,27	81,35	49,06
Média total	45.899.246	2.903.559.333	52,00	48,00	94,00	86,00	63,00

Análise das variantes

O grupo de bioinformática do CIPE fez o alinhamento das sequências com o genoma de referência (Hg19), excluiu as sequências de primers/adaptadores e realizou a chamada de variantes pelo Torrent Variant Caller. Em seguida, foram feitos realinhamento e chamada de variantes pelo pipeline do GATK. A anotação das variantes foi realizada usando o software SnpEff version 3.5d (build 2014-03-05), com script existente *in house*, alinhando as variantes com os bancos públicos: dbNSFP version 2.4; COSMIC v69; 1000genomes; ESP version ESP6500SI-V2; HapMap; dbSNP version 138.

A análise das variantes identificadas foi feita utilizando o software VarSeq (Golden Helix), com o arquivo .vcf de cada amostra. As variantes foram filtradas utilizando os critérios de qualidade (Phred score >20) e cobertura vertical ≥ 20 - quantidade mínima de vezes em que a base foi sequenciada. A primeira etapa foi a

exclusão de todas as variantes com frequência populacional superior a 0,1% em quaisquer dos seguintes bancos de dados públicos: NHLBI – Exome Variant Server (6500 exomas) 1000 Genomes, Exome Aggregation Consortium (ExAC), e dbSNP (dbSNP 137).

Em seguida, utilizamos um critério rigoroso de exclusão: variantes detectadas em todos os 10 exomas deste projeto foram excluídas, sob a presunção de que poderiam ser artefatos de sequenciamento ou polimorfismos da população brasileira. Finalmente, cotejamos nossos dados contra um conjunto independente de 20 exomas existentes no Laboratório de Genética Humana (Dra. Ana Krepischki – IBUSP), derivados de pacientes afetados por fenótipos não relacionados a câncer; todas as variantes também presentes neste grupo adicional de exomas foram excluídas também sob a justificativa de que poderiam representar polimorfismos populacionais.

A partir deste conjunto total de variantes raras, foram selecionadas aquelas mapeadas em éxons e região 5'UTR, com subsequente exclusão de variantes sinônimas. A última etapa de seleção foi a identificação em cada família das variantes que co-segregassem nos pares de afetados. Um total de 214 variantes raras não-sinônimas foi detectado (Anexo 3), uma média de 43 variantes por família, cuja descrição simplificada encontra-se na tabela abaixo.

Tabela 2 - Variantes raras não-sinônimas que co-segregam em dois afetados de cada uma das cinco diferentes famílias estudadas por sequenciamento de exoma.

	Família 1	Família 2	Família 3	Família 4	Família 5	Total
Total de variantes	54	39	59	39	23	214
<i>Missense</i>	49	36	56	35	22	198
<i>Nonsense</i>	1	0	1	2	0	4
<i>5 UTR</i>	1	2	1	1	0	5
Indel	0	1	0	0	0	1
<i>Inframe deletion</i>	0	0	0	0	1	1
<i>Frameshift</i>	3	0	0	0	0	3
<i>Splicing site</i>	0	0	1	1	0	2

Dentre as 214 variantes identificadas, oito são mutações de perda de função (*Loss-of-Function* (LoF)), sendo três delas classificadas como mutações de mudança do quadro de leitura (*Frameshift*), quatro como códon de parada de tradução (*Stop Códon*), e uma como indel (inserção/deleção) com deleção de 9 nucleotídeos (Quadro 6).

Quadro 6 - Variantes raras germinativas causadoras de perda de função proteica (LoF; Loss-of-Function) identificadas por sequenciamento de exoma em cinco famílias de melanoma.

Famílias	Genes	dbSNP	Variantes preditas como patogênicas	RefSeq	Tipo de variante	Genótipo	Éxon	Códon afetado	AA afetado	Frequência ExAC
Família 1	<i>FAM221A</i>	Ausente no dbSNP	n/a	n/a	Frameshift	-_G	4,3	n/a	n/a	n/a
	<i>GPR128</i>	Ausente no dbSNP	n/a	n/a	Frameshift	-_A	14	n/a	n/a	n/a
	<i>SERPINB4</i>	Ausente no dbSNP	n/a	n/a	Frameshift	-_G	6	n/a	n/a	n/a
	<i>UNC93A</i>	rs145360877	1 of 5 Predicted as Damaging	NM_018974.3	Stop códon	C_T	4,5	c.676C>T	p.Arg226Ter	0.002356
Família 2	<i>SSB</i>	Ausente no dbSNP	n/a	n/a	INDEL	-_ATGATGAAC	11	n/a	n/a	n/a
Família 3	<i>HRNR</i>	rs141263661	1 of 5 Predicted as Damaging	NM_001009931.2	Stop códon	A_G	3	c.2527C>T	p.Arg843Ter	0.0002224
Família 4	<i>OR51B5,OR51M1</i>	rs182074434	1 of 5 Predicted as Damaging	NM_001004756	Stop códon	C_G	1	c.141C>G	p.Tyr47Ter	0.001582
	<i>SLC5A11</i>	rs147549055	1 of 5 Predicted as Damaging	NM_052944	Stop códon	A_G	3,4	c.204G>A	p.Trp68Ter	0.0007087

O total de variantes identificado no sequenciamento de exoma afeta 210 genes. Tais genes foram analisados pela ferramenta VarElect (<http://varelect.genecards.org/>), que associa genes com fenótipos, com base em diversos bancos de dados. Nessa análise, utilizamos os seguintes termos para investigação dos genes: melanoma, suscetibilidade a câncer, suscetibilidade a melanoma e pigmentação de pele. O quadro a seguir contém os principais genes associados a esses termos, como resultantes da análise.

Quadro 7 - Variantes raras (frequência $\leq 0,01\%$) associadas aos fenótipos pesquisados: melanoma, pigmentação de pele e suscetibilidade a câncer e/ou melanoma.

SNP (rs)*	Minor allele	Frequência no 1000G**	Gene	Nome do gene	Fenótipo
rs140248487	T	0,0003	<i>ITGA3</i>	Integrin, Alpha 3 (Antigen CD49C, Alpha 3 Subunit Of VLA-3 Receptor)	Melanoma
---	A	-	<i>RECK</i>	Reversion-Inducing-Cysteine-Rich Protein With Kazal Motifs	Melanoma
rs202017641	A	0,002	<i>COL4A2</i>	Collagen, Type IV, Alpha 2	Pigmentação de pele
rs41298135	A	0,003	<i>MYO7A</i>	Myosin VIIA	Pigmentação de pele, melanoma e suscetibilidade a melanoma
rs149404061	T	0,001	<i>ADAMTS4</i>	ADAM Metallopeptidase With Thrombospondin Type 1 Motif, 4	Melanoma
rs143784823	T	0,004	<i>HPS5</i>	Hermansky-Pudlak Syndrome 5	Pigmentação de pele
rs149908041	C	0,0009	<i>ZFX3</i>	Zinc Finger Homeobox 3	Suscetibilidade a câncer
rs4987238, rs140768346	T, A	0,001/ 0,002	<i>WRN</i>	Werner Syndrome, RecQ Helicase-Like	Suscetibilidade a câncer
rs143789597	T	0,001	<i>TYMP</i>	Thymidine Phosphorylase	Melanoma
rs148636199	A	0,00007	<i>MCM3</i>	Minichromosome Maintenance Complex Component 3	Melanoma
rs140017366	A	0,0008	<i>MLPH</i>	Melanophilin	Pigmentação de pele
rs142626186	T	0,003	<i>VNN2</i>	Vanin 2	Pigmentação de pele
rs35147930	T	0,004	<i>NID2</i>	Nidogen 2 (Osteonidogen)	Pigmentação de pele
rs143417693	T	0,003	<i>SLIT2</i>	Slit Homolog 2 (Drosophila)	Pigmentação de pele
rs185994757	T	0,003	<i>CTBP2</i>	C-Terminal Binding Protein 2	Suscetibilidade a câncer
rs41317483	A	0,002	<i>HMCN1</i>	Hemicentin 1	Pigmentação de pele

*rs: número de referência da variante no dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>); **Frequência do MAF (*minor allele frequency*) de acordo com os 1000 Genomes Project.

Adicionalmente, o grupo de genes foi analisado utilizando a ferramenta *network* do site CBioPortal, que compila informações de bancos de dados públicos de vias (*HPRD*, *Reactome*, *NCI-Nature Pathway Interaction Database*, and the *MSKCC Cancer Call Map*). A seguir, a Figura 11 representa as redes de interação desses genes com destaque para os genes *SLIT2*, *ITGA3* e *MCM3*, que interagem diretamente com os genes *RAC1*, *JAK2* e *POLE*, respectivamente. Além disso, o gene *WRN* também interage diretamente com *CDKN2A*, *TP53* e *PARP1*. A rede contém 66 genes, 16 deles identificados com variantes em nosso estudo e outros 50 adicionais.

A seguir, apresentamos o heredograma de cada uma das cinco famílias cujo exoma foi estudado, seguido pela respectiva lista descritiva das variantes genômicas raras não-sinônimas potencialmente patogênicas identificadas nos dois afetados da família. Dentre as variantes raras identificadas, selecionamos as mutações de perda de função e as variantes não-sinônimas avaliadas como possivelmente patogênicas em pelo menos três de cinco diferentes algoritmos de predição de comprometimento da função proteica: SIFT, Polyphen2, LRT, Mutation Taster, Mutation Assessor, e FATHMM (Figura 12)

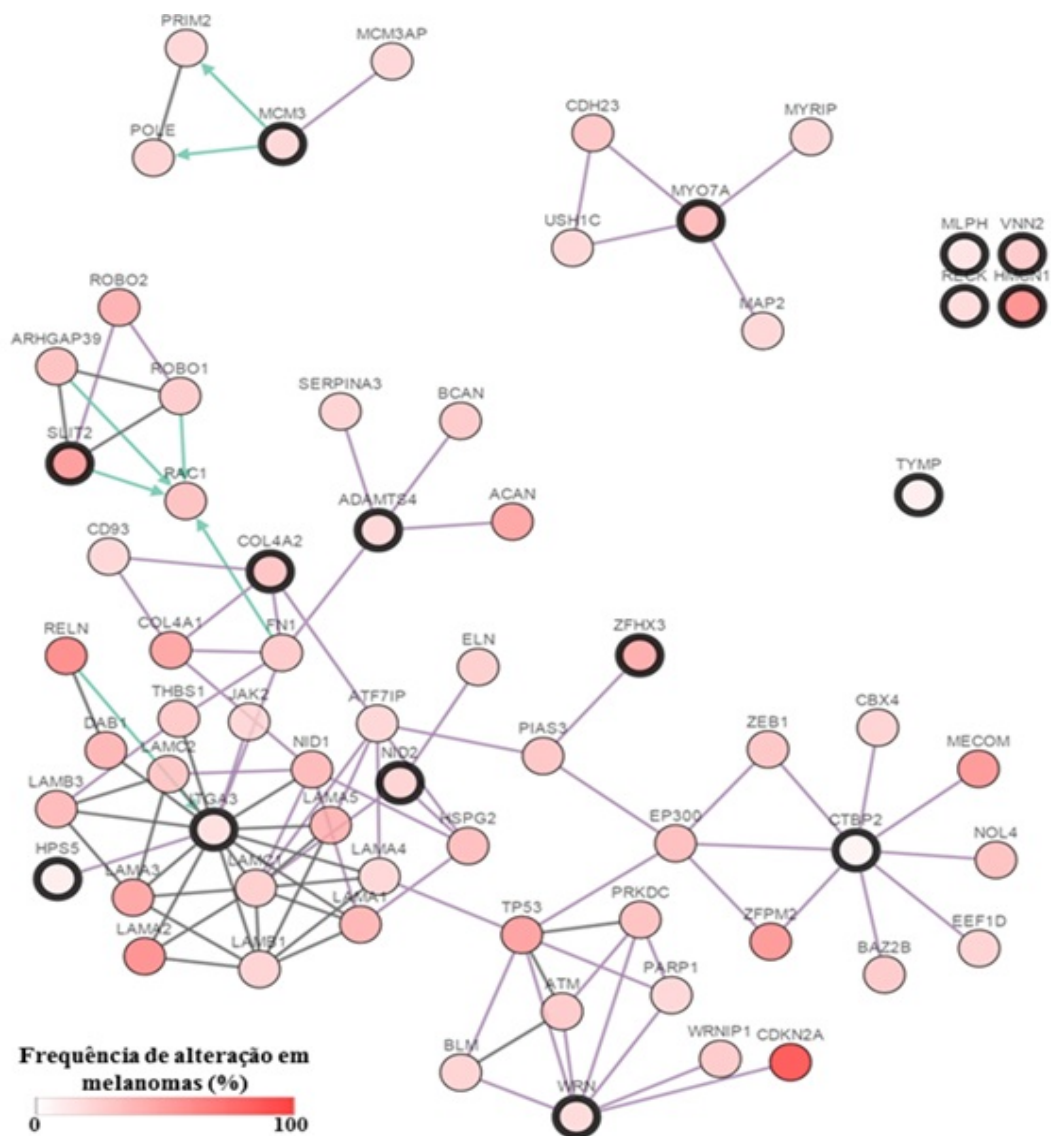


Figura 11 - Redes de interação dos genes identificados com variantes raras nos pacientes com predisposição a melanoma. A cor dos genes é referente à frequência de alterações que os mesmos se encontram em melanomas segundo estudo do TCGA.

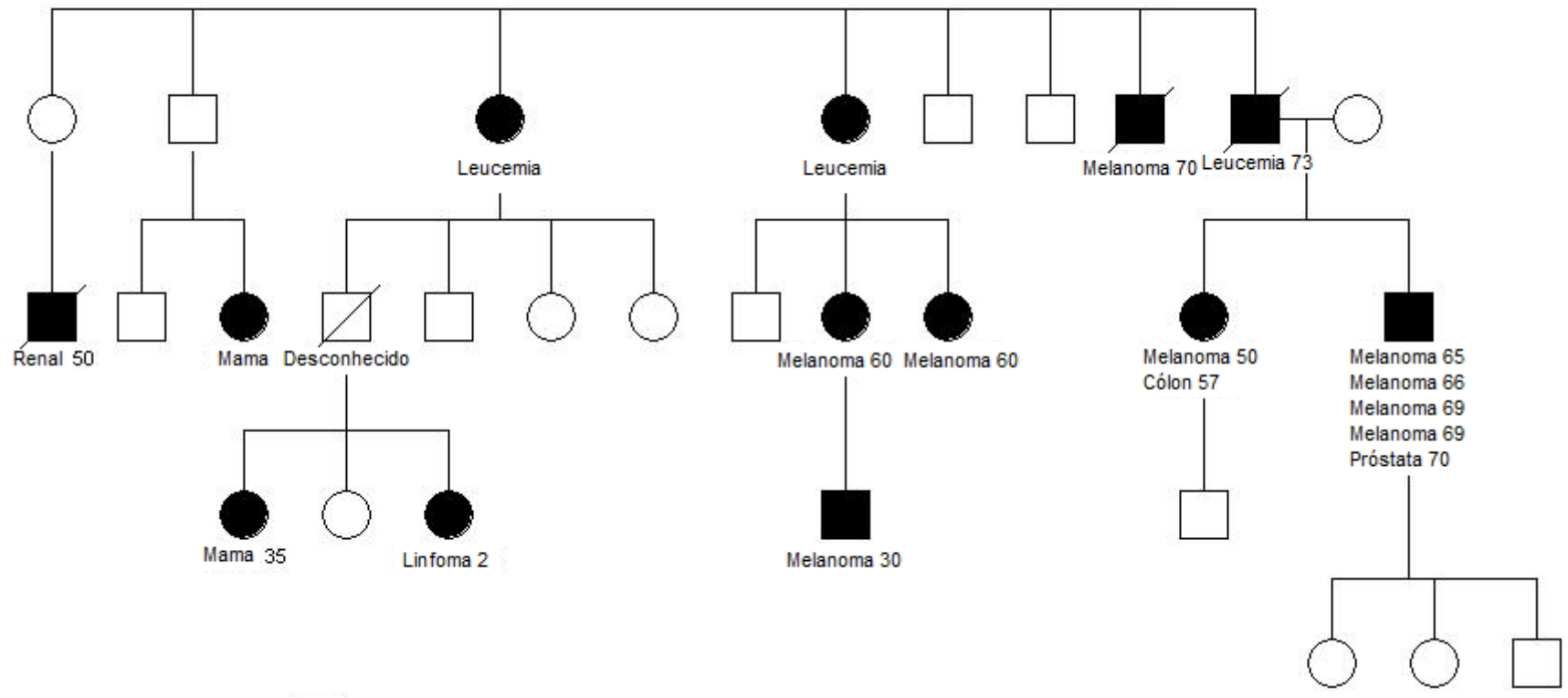


Figura 12 - Heredograma representando a Família 1.

Quadro 8 - Genes com variantes raras (frequência <0,01%) categorizadas como possivelmente patogênicas de acordo com mínimo de três diferentes algoritmos (SIFT, Polyphen2, LRT, Mutation Taster, Mutation Assessor e FATHMM), identificadas na **Família 1**. Cada variante está descrita de acordo com a nomenclatura do dbSNP (se presente), posição genômica, sequência NM (RefSeq), tipo de variante, códon afetado, genótipo e aminoácido alterado.

Família 1	Genes	SNP	Variantes possivelmente patogênicas	Posição genômica	RefSeq	Tipo de variante	Códon afetado	Genótipo	Aminoácido afetado
	<i>ANKRD37</i>	rs115813463	Predito como danoso em 3 algoritmos	4:186318377	NM_181726	Missense	c.101C>T	Heterozigose	p.Pro34Leu
	<i>GAL3ST4</i>	rs142988850	Predito como danoso em 3 algoritmos	7:99764240	NM_024637	Missense	c.314T>C	Heterozigose	p.Phe105Ser
	<i>KCNK5</i>	rs41273124	Predito como danoso em 3 algoritmos	6:39159072	NM_003740	Missense	c.1094A>T	Heterozigose	p.Lys365Ile
	<i>KMT2E</i>	rs151289792	Predito como danoso em 3 algoritmos	7:104747094	NM_018682	Missense	c.2722C>T	Heterozigose	p.Pro908Ser
	<i>NPHP4</i>	rs139022622	Predito como danoso em 3 algoritmos	1:5926503	NM_015102	Missense	c.3574C>T	Heterozigose	p.Arg1192Trp
	<i>OR14J1</i>	rs143005910	Predito como danoso em 3 algoritmos	6:29275029	NM_030946	Missense	c.563C>G	Heterozigose	p.Ser188Cys
	<i>STK11IP</i>	rs149218768	Predito como danoso em 3 algoritmos	2:220470710	NM_052902	Missense	c.778G>A	Heterozigose	p.Asp260Asn
	<i>CCDC135</i>	rs114195136	Predito como danoso em 4 algoritmos	16:57758736	NM_032269	Missense	c.1747C>T	Heterozigose	p.Arg583Trp
	<i>DUSP27</i>	rs138472448	Predito como danoso em 4 algoritmos	1:167096982	NM_001080426	Missense	c.2614A>G	Heterozigose	p.Lys872Glu
	<i>PDE4C</i>	rs147234546	Predito como danoso em 4 algoritmos	19:18330088	NM_000923	Missense	c.922C>G	Heterozigose	p.Pro308Ala
	<i>RARS2</i>	rs143389605	Predito como danoso em 4 algoritmos	6:88258318	NM_020320	Missense	c.442A>G	Heterozigose	p.Thr148Ala

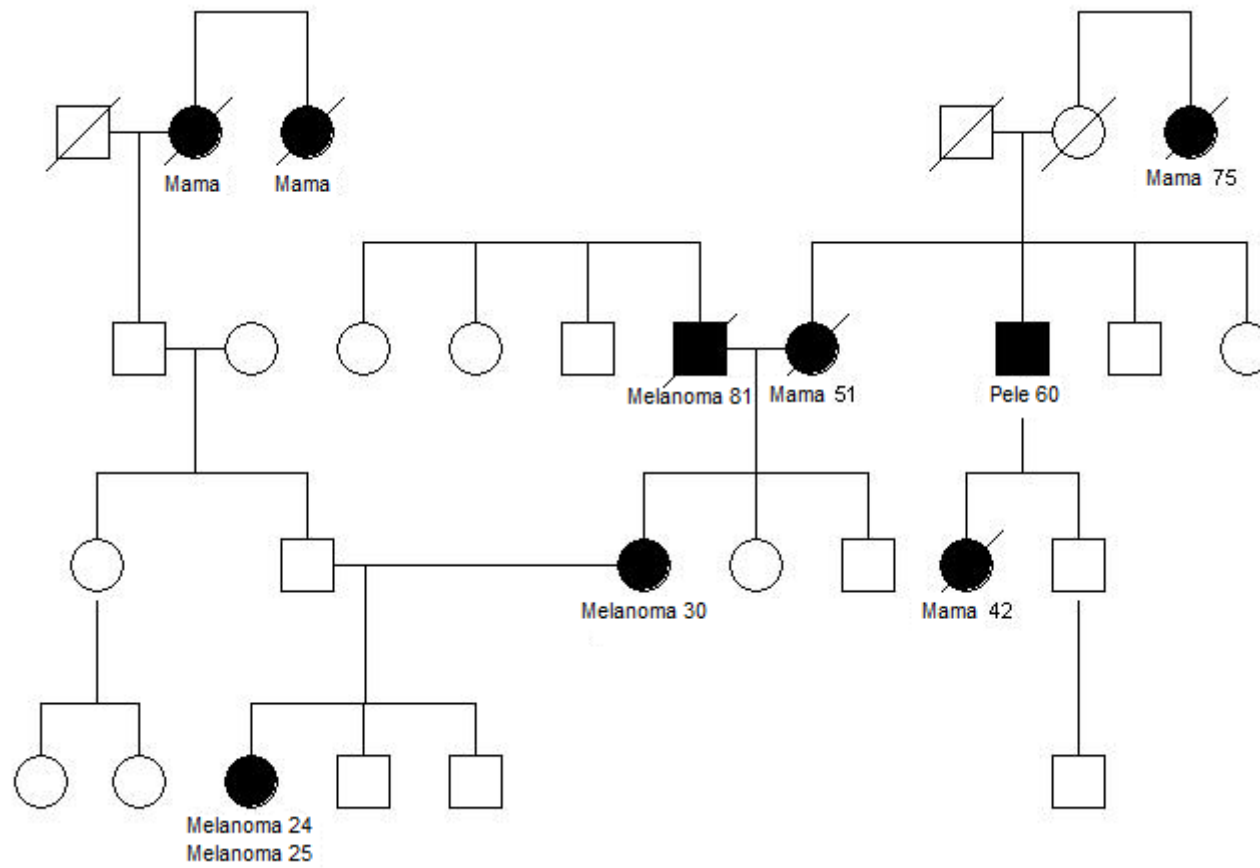


Figura 13 - Heredograma representando a Família 2.

Quadro 9 - Genes com variantes raras (frequência <0,01%) categorizadas como possivelmente patogênicas de acordo com mínimo de três diferentes algoritmos (SIFT, Polyphen2, LRT, Mutation Taster, Mutation Assessor e FATHMM), identificadas na **Família 2**. Cada variante está descrita de acordo com a nomenclatura do dbSNP (se presente), posição genômica, sequência NM (RefSeq), tipo de variante, códon afetado, genótipo e aminoácido alterado.

Família 2	Genes	SNP	Variante(s) possivelmente patogênicas	Posição genômica	RefSeq	Tipo de variante	Códon afetado	Genótipo	Aminoácido afetado
	<i>CEP290</i>	rs201988582	Predito como danoso em 3 algoritmos	12:88519120	NM_025114.3	Missense	c.1092T>G	Heterozigose	p.Ile364Met
	<i>EFHC1</i>	rs137852776*	Predito como danoso em 3 algoritmos	6:52317597	NM_018100.3	Missense	c.685T>C	Heterozigose	p.Phe229Leu
	<i>GDF2</i>	rs142402214	Predito como danoso em 3 algoritmos	10:48414216	NM_016204.2	Missense	c.652G>A	Heterozigose	p.Asp218Asn
	<i>IHH</i>	rs140093604	Predito como danoso em 3 algoritmos	2:219920308	NM_002181.3	Missense	c.857C>T	Heterozigose	p.Pro286Leu
	<i>PTPRR</i>	rs142559906	Predito como danoso em 3 algoritmos	12:71286499	NM_002849.3	Missense	c.317T>A	Heterozigose	p.Val106Glu
	<i>SLC6A5</i>	rs75450512	Predito como danoso em 3 algoritmos	11:20676326	NM_004211.3	Missense	c.2306G>A	Heterozigose	p.Arg769His
	<i>ZMYM4</i>	rs142484548	Predito como danoso em 3 algoritmos	1:35885121	NM_005095.2	Missense	c.4490G>A	Heterozigose	p.Arg1497His
	<i>BPFL</i>	rs140507260	Predito como danoso em 4 algoritmos	6:3152781	NM_004332.3	Missense	c.848A>G	Heterozigose	p.Asn283Ser
	<i>DHX33</i>	rs141223137	Predito como danoso em 4 algoritmos	17:5364393	NM_020162.3	Missense	c.715T>C	Heterozigose	p.Phe239Leu
	<i>DNAH1</i>	rs61734644	Predito como danoso em 4 algoritmos	3:52384594	NM_015512.4	Missense	c.2717A>G	Heterozigose	p.Asp906Gly
	<i>MIR548F1,TPR</i>	rs201004855	Predito como danoso em 4 algoritmos	1:186313197	NM_003292.2	Missense	c.3443G>A	Heterozigose	p.Arg1148His
	<i>MYO7A</i>	rs41298135	Predito como danoso em 5 algoritmos	11:76869378	NM_000260.3	Missense	c.905G>A	Heterozigose	p.Arg302His

*Variantes descritas no OMIM.

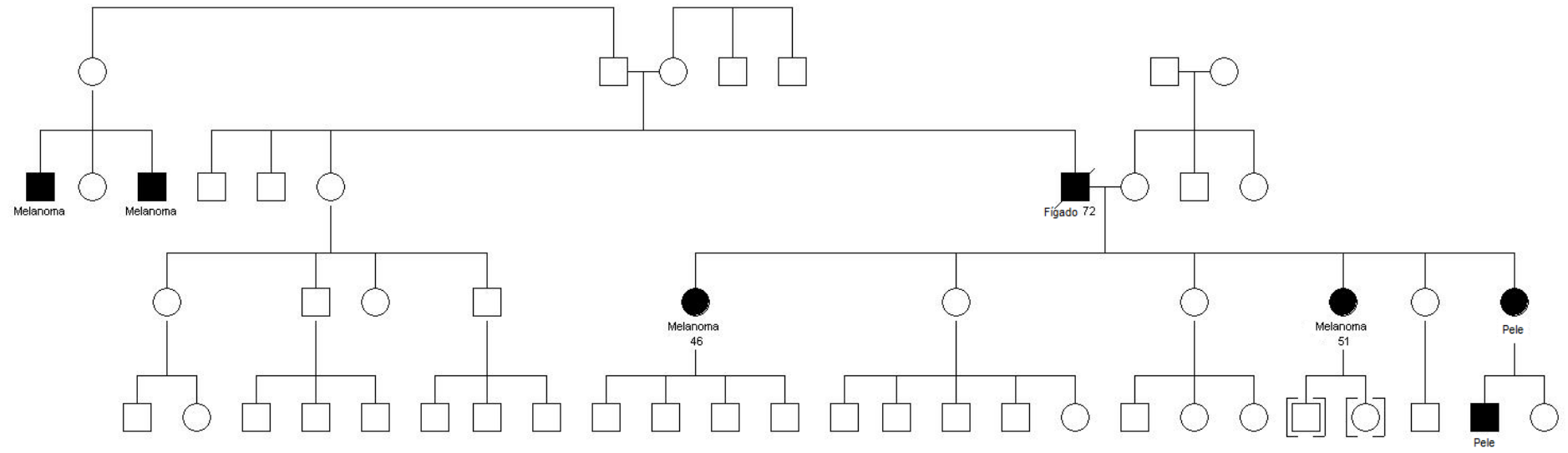


Figura 14 - Heredograma representando a Família 3.

Quadro 10 - Genes com variantes raras (frequência <0,1%) categorizadas como possivelmente patogênicas de acordo com mínimo de três diferentes algoritmos (SIFT, Polyphen2, LRT, Mutation Taster, Mutation Assessor e FATHMM), identificadas na **Família 3**. Cada variante está descrita de acordo com a nomenclatura do dbSNP (se presente), posição genômica, sequência NM (RefSeq), tipo de variante, códon afetado, genótipo e aminoácido alterado.

Família 3	Genes	SNP	Variante(s) possivelmente patogênicas	Posição genômica	RefSeq	Tipo de variante	Códon afetado	Genótipo	Aminoácido afetado
	<i>ACO1</i>	rs41313772	Predito como danoso em 3 algoritmos	9:32405589	NM_002197.2	Missense	c.85G>T	Heterozigose	p.Asp29Tyr
	<i>ANKMY1</i>	rs149558313	Predito como danoso em 3 algoritmos	2:241439525	NM_017844.3	Missense	c.1717C>T	Heterozigose	p.Arg573Cys
	<i>KANSLIL</i>	rs148825055	Predito como danoso em 3 algoritmos	2:211018702	NM_152519.3	Missense	c.605C>T	Heterozigose	p.Pro202Leu
	<i>LRP1B</i>	rs79879036	Predito como danoso em 3 algoritmos	2:141092084	NM_018557.2	Missense	c.12161A>C	Heterozigose	p.Glu4054Ala
	<i>PRDM1</i>	rs139534654	Predito como danoso em 3 algoritmos	6:106543549	NM_001198.3	Missense	c.351A>G	Heterozigose	p.Ile117Met
	<i>SLC25A47</i>	rs145556108	Predito como danoso em 3 algoritmos	14:100795869	NM_207117.2	Missense	c.814C>T	Heterozigose	p.Arg272Trp
	<i>WDR52</i>	rs185086524	Predito como danoso em 3 algoritmos	3:113022889	NM_001164496.1	Missense	c.4951C>T	Heterozigose	p.Arg1651Trp
	<i>ZFAT</i>	rs75596750	Predito como danoso em 3 algoritmos	8:135622851	NM_020863.3	Missense	c.496C>T	Heterozigose	p.Arg166Trp
	<i>ZNF430</i>	rs139084188	Predito como danoso em 3 algoritmos	19:21239487	NM_025189.3	Missense	c.373G>T	Heterozigose	p.Asp125Tyr
	<i>MCM3</i>	rs148636199	Predito como danoso em 4 algoritmos	6:52138606	NM_002388.4	Missense	c.1618C>T	Heterozigose	p.Arg540Trp
	<i>NID2</i>	rs35147930	Predito como danoso em 4 algoritmos	14:52505546	NM_007361.3	Missense	c.2176G>A	Heterozigose	p.Val726Met
	<i>TBC1D32</i>	rs191814118	Predito como danoso em 4 algoritmos	6:121562641	NM_152730.5	Missense	c.2215G>A	Heterozigose	p.Ala739Thr
	<i>TRAP1</i>	rs61758086	Predito como danoso em 4 algoritmos	16:3736085	NM_016292.2	Missense	c.383G>T	Heterozigose	p.Arg128Leu
	<i>AQP6</i>	rs200570924	Predito como danoso em 5 algoritmos	12:50367213	NM_001652.3	Missense	c.257C>T	Heterozigose	p.Thr86Met
	<i>VNN2</i>	rs142626186	Predito como danoso em 5 algoritmos	6:133076999	NM_078488.2	Missense	c.361G>A	Heterozigose	p.Val121Met

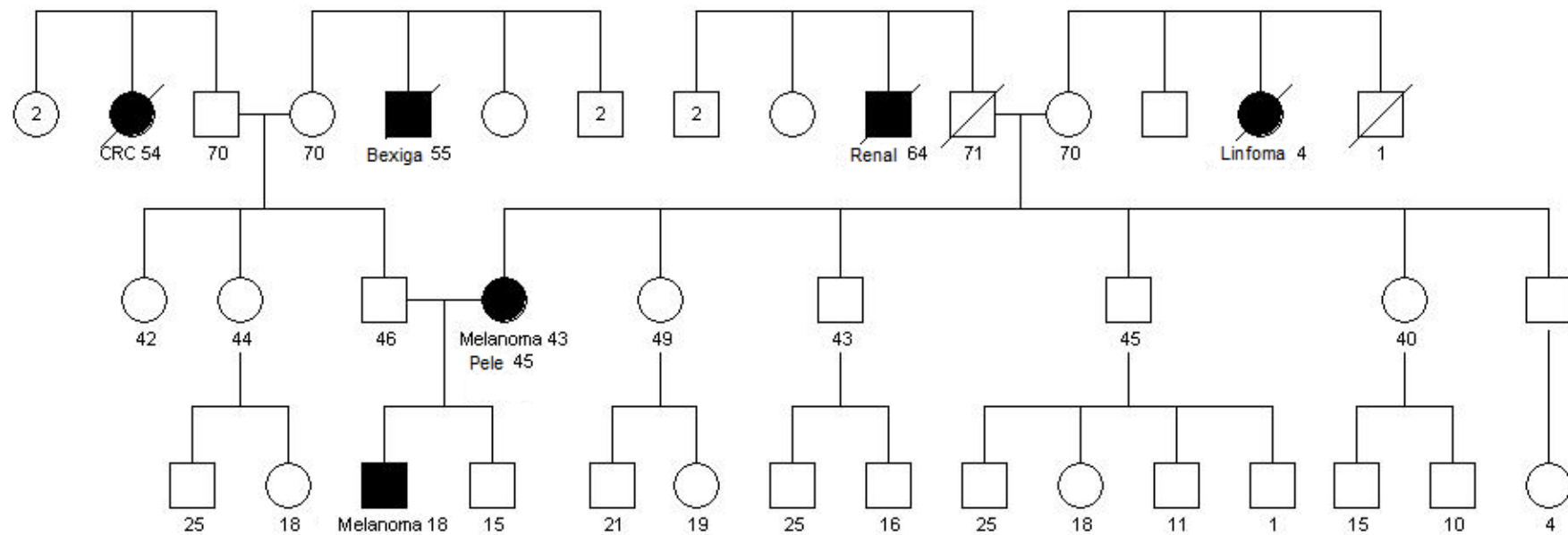


Figura 15 - Heredograma representando a Família 4.

Quadro 11 - Genes com variantes raras (frequência <0,1%) categorizadas como possivelmente patogênicas de acordo com mínimo de três diferentes algoritmos (SIFT, Polyphen2, LRT, Mutation Taster, Mutation Assessor e FATHMM), identificadas na **Família 4**. Cada variante está descrita de acordo com a nomenclatura do dbSNP (se presente), posição genômica, sequência NM (RefSeq), tipo de variante, códon afetado, genótipo e aminoácido alterado.

Família 4	Genes	SNP	Variantes possivelmente patogênicas	Posição genômica	RefSeq	Tipo de variante	Códon afetado	Genótipo	Aminoácido afetado
	<i>DAAM2</i>	rs183543237	Predito como danoso em 3 algoritmos	6:39846016	NM_015345.3	Missense	c.1339C>G	Heterozigose	p.Gln447Glu
	<i>GNAI4</i>	rs61755085	Predito como danoso em 3 algoritmos	9:80040495	NM_004297.3	Missense	c.860A>G	Heterozigose	p.Tyr287Cys
	<i>ID3</i>	rs146163818	Predito como danoso em 3 algoritmos	1:23885773	NM_002167.4	Missense	c.145T>A	Heterozigose	p.Ser49Thr
	<i>MYH6</i>	rs143978652*	Predito como danoso em 3 algoritmos	14:23862646	NM_002471.3	Missense	c.3010G>T	Heterozigose	p.Ala1004Ser
	<i>PEX7</i>	rs113268723	Predito como danoso em 3 algoritmos	6:137166790	NM_000288.3	Missense	c.377A>C	Heterozigose	p.Gln126Pro
	<i>SYNM</i>	rs187807624	Predito como danoso em 3 algoritmos	15:99671591	NM_145728.2	Missense	c.3026T>C	Heterozigose	p.Val1009Ala
	<i>TENM4</i>	rs201179027	Predito como danoso em 3 algoritmos	11:78383209	NM_001098816.2	Missense	c.5662T>A	Heterozigose	p.Ser1888Thr
	<i>TMEM114</i>	rs141472774	Predito como danoso em 3 algoritmos	16:8620007	NM_001146336.1	SAS**	c.440C>T	Heterozigose	p.Ala147Val
	<i>C15orf27</i>	rs149378942	Predito como danoso em 4 algoritmos	15:76452476	NM_152335.2	Missense	c.423C>G	Heterozigose	p.Ile141Met
	<i>C1orf145,OBSCN</i>	rs191837710	Predito como danoso em 4 algoritmos	1:228399519	NM_052843.3	Missense	c.35T>A	Heterozigose	p.Phe12Tyr
	<i>C8orf74</i>	rs186803488	Predito como danoso em 4 algoritmos	8:10532237	NM_001040032.1	Missense	c.130C>A	Heterozigose	p.Leu44Met
	<i>CORO7-PAM16,CORO7,VASN</i>	rs148092711	Predito como danoso em 4 algoritmos	16:4431767	NM_138440.2	Missense	c.889C>T	Heterozigose	p.Arg297Cys
	<i>EZH1</i>	rs146736585	Predito como danoso em 4 algoritmos	17:40879667	NM_001991.3	Missense	c.232C>A	Heterozigose	p.Pro78Thr
	<i>HELZ2</i>	rs116816080	Predito como danoso em 4 algoritmos	20:62198961	NM_033405.3	Missense	c.43C>T	Heterozigose	p.Arg15Trp
	<i>KPNA7</i>	rs116916633	Predito como danoso em 4 algoritmos	7:98786092	NM_001145715.1	Missense	c.731C>T	Heterozigose	p.Pro244Leu
	<i>KRT77</i>	rs150981240	Predito como danoso em 4 algoritmos	12:53086341	NM_175078.2	Missense	c.1291C>A	Heterozigose	p.Leu431Met
	<i>MPEG1</i>	rs143527301	Predito como danoso em 4 algoritmos	11:58980122	NM_001039396.1	Missense	c.217A>G	Heterozigose	p.Thr73Ala

*Variantes descritas no OMIM; **sítio de *splicing*.

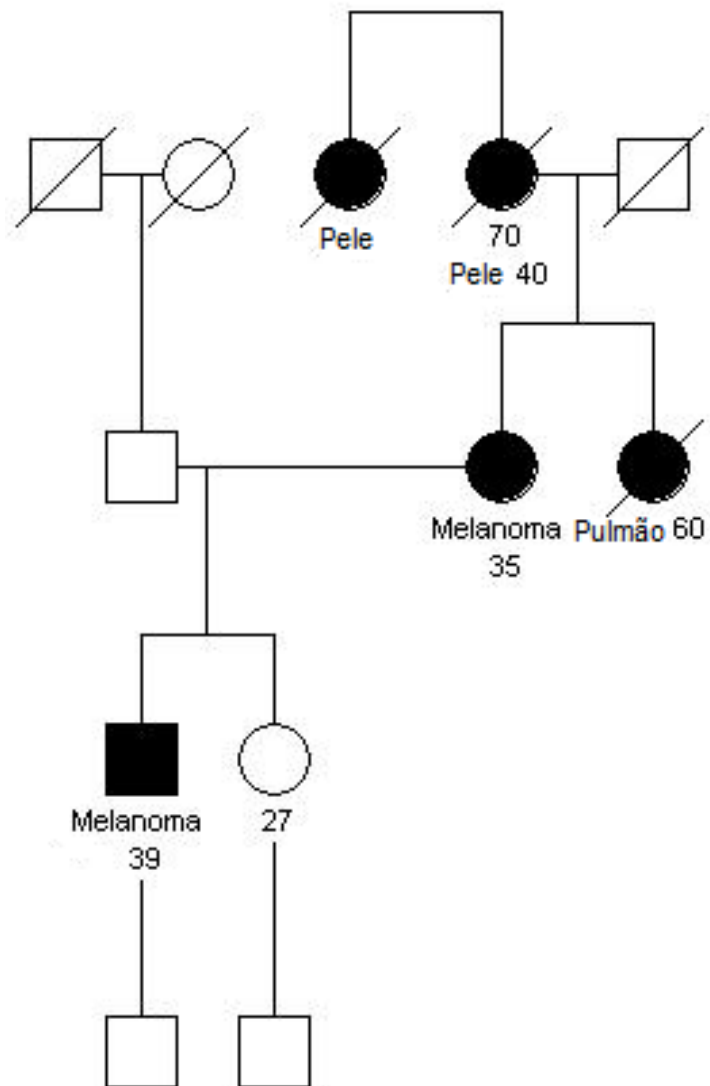


Figura 16 - Heredograma representando a Família 5.

Quadro 12 - Genes com variantes raras (frequência <0,1%) categorizadas como possivelmente patogênicas de acordo com mínimo de três diferentes algoritmos (SIFT, Polyphen2, LRT, Mutation Taster, Mutation Assessor e FATHMM), identificadas na **Família 5**. Cada variante está descrita de acordo com a nomenclatura do dbSNP (se presente), posição genômica, sequência NM (RefSeq), tipo de variante, códon afetado, genótipo e aminoácido alterado.

Família 5	Genes	SNP	Variantes possivelmente patogênicas	Posição genômica	RefSeq	Tipo de variante	Códon afetado	Genótipo	Aminoácido afetado
	<i>FO XK2</i>	rs146173102	Predito como danoso em 3 algoritmos	17:80544980	NM_004514.3	Missense	c.1618G>A	Heterozigose	p.Gly540Ser
	<i>HMCN1, MIR548F1</i>	rs41317483	Predito como danoso em 3 algoritmos	1:186072727	NM_031935.2	Missense	c.10697G>A	Heterozigose	p.Gly3566Asp
	<i>IL17RC</i>	rs143412184	Predito como danoso em 3 algoritmos	3:9959753	NM_153461.3	Missense	c.487G>A	Heterozigose	p.Val163Met
	<i>CTBP2</i>	rs185994757	Predito como danoso em 4 algoritmos	10:126715118	NM_022802.2	Missense	c.1211G>A	Heterozigose	p.Arg404His
	<i>KRT82</i>	rs139209735	Predito como danoso em 4 algoritmos	12:52790747	NM_033033.3	Missense	c.988C>T	Heterozigose	p.Arg330Cys
	<i>SERPINA11</i>	rs61738925	Predito como danoso em 4 algoritmos	14:94914667	NM_001080451.1	Missense	c.445C>T	Heterozigose	p.Pro149Ser
	<i>UPP1</i>	rs116578494	Predito como danoso em 4 algoritmos	7:48146994	NM_181597.1	Missense	c.683C>T	Heterozigose	p.Thr228Met
	<i>TCF15</i>	rs141645685	Predito como danoso em 5 algoritmos	20:585267	NM_004609.3	Missense	c.568G>A	Heterozigose	p.Gly190Arg

A partir desse grupo de genes, realizamos uma análise usando o software *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA), a fim de identificar redes e vias representativas relacionadas a esses genes. Esse grupo associou-se principalmente a câncer, função e doenças dermatológicas e melanoma. A tabela abaixo indica a categoria, a função e/ou doença e os genes envolvidos.

Tabela 3 - Funções celulares e doenças associadas aos 63 genes nos quais variantes raras não-sinônimas foram consideradas como possivelmente danosas por no mínimo 3 diferentes algoritmos de predição de dano proteico.

Categoria	Função ou doença	Genes	p-valor
Cancer, anormalidades e injúrias do organismo	Melanoma	<i>ACO1, ANKMY1, AQP6, C8orf74, CEP290, CORO7/CORO7-PAM16, CTBP2, DAAM2, DHX33, DNAH1, DUSP27, EFHC1, EZH1, FOXP2, GAL3ST4, GDF2, GNA14, HELZ2, HMCN1, IL17RC, KCNK5, KMT2E, KRT77, KRT82, LRP1B, MPEG1, MYH6, MYO7A, NID2, NPHP4, OBSCN, OR14J1, PDE4C, PRDM1, PTPRR, SERPINA11, SLC25A47, SLC6A5, STK11IP, SYNM, TENM4, TPR, VNN2, ZFAT, ZNF430</i>	0,00016
Câncer, doenças dermatológicas, anormalidades e injúrias do organismo	Melanoma cutâneo e câncer	<i>ACO1, AQP6, CEP290, CORO7/CORO7-PAM16, DHX33, DNAH1, DUSP27, EZH1, GDF2, GNA14, HELZ2, HMCN1, IL17RC, KCNK5, KRT77, KRT82, LRP1B, MYH6, MYO7A, NID2, NPHP4, OBSCN, PDE4C, PRDM1, PTPRR, SERPINA11, SLC6A5, STK11IP, SYNM, TENM4, TPR, VNN2, ZFAT</i>	0,00016
Sobrevivência e morte celular	Degradação de fotorreceptores	<i>MYO7A</i>	0,00312
Montagem e organização celular, função e manutenção celular	Localização de melanossomos	<i>MYO7A</i>	0,00623
Ciclo celular	Parada de células tumorais em fase G1	<i>ID3, KMT2E, SYNM</i>	0,019
Montagem e organização celular, função e manutenção celular	Movimento de melanossomos	<i>MYO7A</i>	0,0368
Ciclo celular, Desenvolvimento e função de pele e cabelos	Parada de células epiteliais em fase G1	<i>KMT2E</i>	0,0368
Ciclo celular e replicação, recombinação e reparo do DNA	<i>Checkpoint</i> de células em mitose	<i>TPR</i>	0,0488

p-value > 0.05

A principal rede gênica formada nessa análise se associa a câncer, doenças dermatológicas, anormalidades e injúrias do organismo (Figura 12). A imagem representa a rede criada usando o IPA baseada na interação dos genes potencialmente patogênicos identificados nos cinco pares de afetados sequenciados. Em cinza estão representados 22 genes do grupo de 63 inicialmente plotados para a análise; em branco estão representados 13 genes automaticamente incluídos na rede por estarem biologicamente relacionados aos outros por evidências científicas.

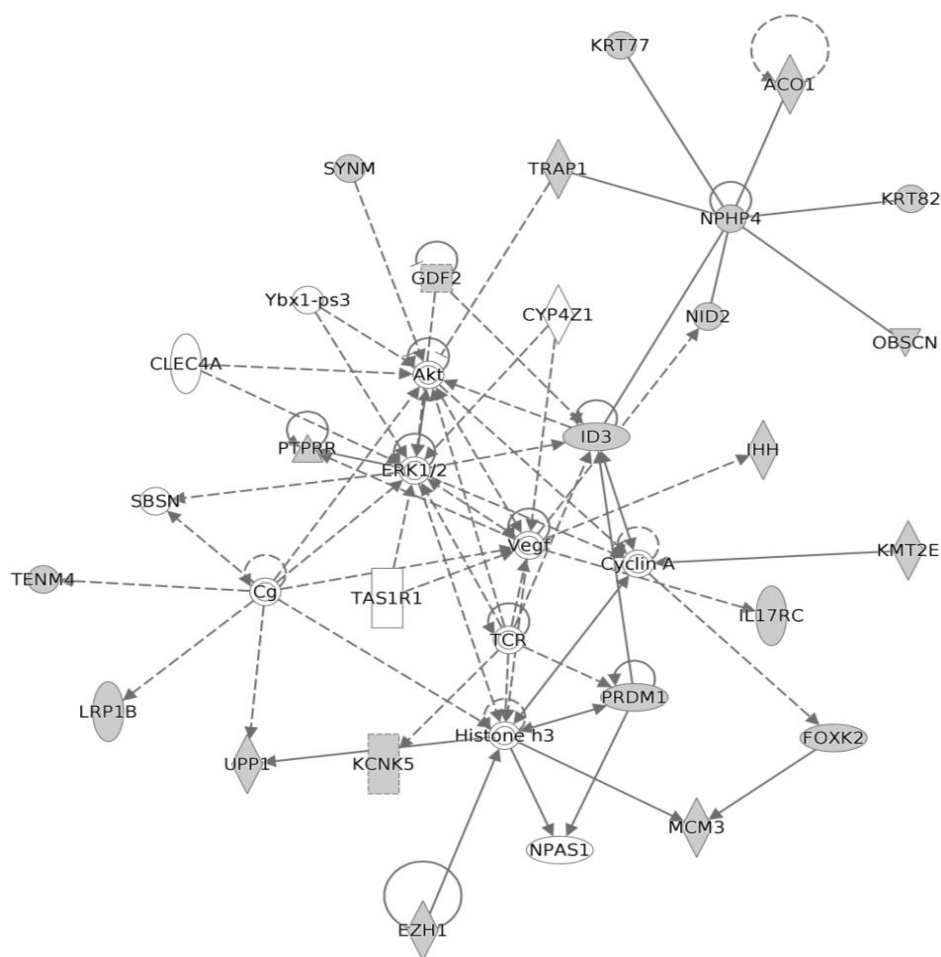


Figura 17 - Rede dos genes que associados a câncer, doenças dermatológicas, anormalidades e injúrias do organismo. Representados em cinza, genes que identificamos com variantes em nossos probandos e em branco, genes que foram plotados pelo software por estarem relacionados entre si por evidências científicas.

Em uma análise global feita com este grupo de genes identificados com variantes germinativas no melanoma hereditário, os que se encontram mais frequentemente alterados com mutações somáticas em melanomas do estudo do TCGA foram os genes *MUC16*, *LRP1B*, *PKHD1L1*, *CSMD2*, *HMCN1*, *OBSCN* e *NUP153*, a maioria com predomínio de mutações *missense* (Figura 18). Devido à grande quantidade de genes, a imagem a seguir mostra apenas genes alterados somaticamente em pelo menos 20% dos melanomas do TCGA.

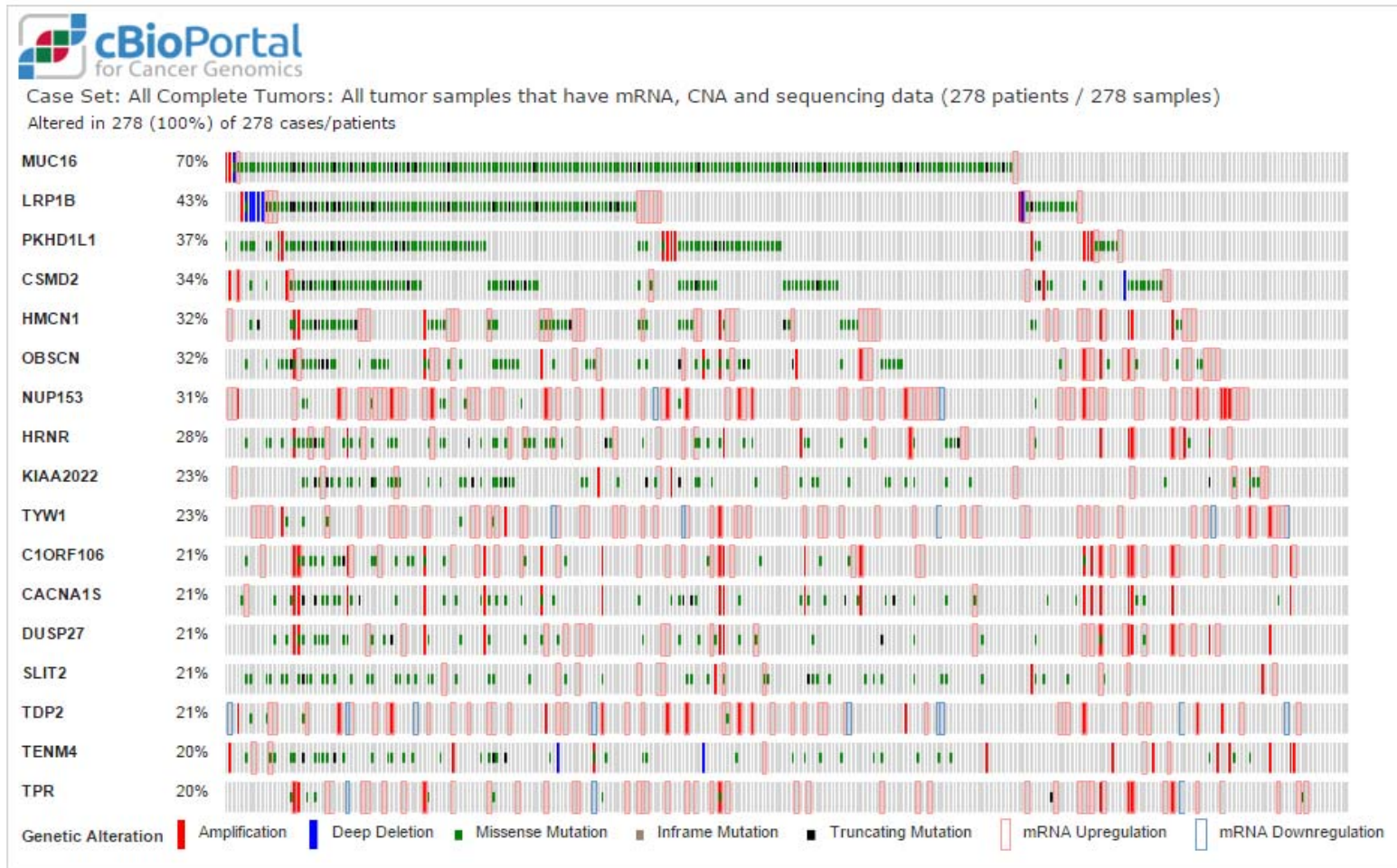


Figura 18 - Frequência de alteração somática dos genes alterados em pelo menos 20% de melanomas do estudo TCGA (*The Cancer Genome Atlas*).

6 DISCUSSÃO

As primeiras evidências sobre famílias com predisposição ao desenvolvimento de tumores datam de mais de 150 anos (Broca 1866 e Boveri 1914, citados por RAHMAN 2014, p.302). Entretanto, apenas a partir dos anos 80 os primeiros genes envolvidos na predisposição a câncer começaram a ser identificados (FUNG et al. 1987). Atualmente, mais de 100 genes associados a uma alta predisposição a câncer são conhecidos (RAHMAN 2014).

Correspondendo à menor parte dos tumores de pele, melanomas são, no entanto, causa de aproximadamente 80% dos óbitos por câncer de pele (MILLER e MIHM 2006). Dentre todos os casos de melanoma 10% são hereditários (HANSEN et al. 2004). A identificação de genes de predisposição não apenas auxilia a elucidar os mecanismos de suscetibilidade ao melanoma, como também lança luz sobre as vias de sinalização potencialmente envolvidas na melanomagênese, além de propiciar aconselhamento genético adequado para as famílias.

A indicação do teste genético para melanoma é de certa forma controversa, visto que variantes de alta penetrância não são comuns e, aparentemente, há a contribuição de diversos fatores adicionais que modulariam a manifestação do risco genético (penetrância). A vigilância intensificada e mais regular da pele pode ser uma abordagem útil para um paciente com suscetibilidade conhecida (READ et al. 2016). Entretanto, com o teste genético é possível identificar em famílias com mutações em genes de alta penetrância aqueles indivíduos não-portadores, que estariam, assim, livres da vigilância permanente.

Os primeiros genes associados à predisposição a melanomas foram *CDKN2A* e *CDK4* (HUSSUSSIAN et al. 1994; KAMB et al. 1994; ZUO et al. 1996). Porém, com o advento de novas técnicas de sequenciamento, a partir de 2010 novos genes foram identificados, sempre em um número muito pequeno de famílias e indivíduos (AOUDE et al. 2015). A tabela a seguir descreve os genes de suscetibilidade já identificados, o tipo de mutação, o número de famílias descritas, além de outros tipos de tumores eventualmente associados a essas mutações.

Quadro 13 - Genes com mutações de alta penetrância associadas à predisposição ao melanoma cutâneo.

Gene	Tipo de mutação	Famílias reportadas	Outros tumores associados
<i>ACD</i>	Inativadora (missense e nonsense)	6 famílias	-
<i>BAP1</i>	Inativadora (frameshift e splicing)	24 famílias	Melanoma uveal, mesotelioma, carcinoma renal, colangiocarcinoma, carcinoma de células basais
<i>CDK4</i>	Ativadora (missense)	17 famílias	-
<i>CDKN2A (p16)</i>	Inativadora (missense, nonsense, promotor, frameshift, inserção in-frame, splicing e deleção do gene)	~ 40% das famílias com melanoma familiar	Pâncreas
<i>CDKN2A (p14)</i>	Inativadora (frameshift, splicing e deleção do gene)	~ 1% das famílias com melanoma familiar	Tumores de sistema nervoso central
<i>MITF</i>	Inativadora (missense)	< 1% dos casos de melanoma	Carcinoma de células renais
<i>POT1</i>	Inativadora (missense e splicing)	12 famílias	Glioma
<i>TERF2IP</i>	Inativadora (missense e nonsense)	5 famílias	-
<i>TERT</i>	Ativadora (promotor do gene)	1 família	-

Fonte: Adaptado de AOUDE et al. (2014)

Novos genes e regiões genômicas candidatos à suscetibilidade aumentada ao câncer têm sido identificados pela investigação de CNVs no genoma de indivíduos com alto risco de câncer (LUCITO et al. 2007; VENKATACHALAM et al. 2011; YANG et al. 2012). Exemplificando, dois trabalhos conduzidos em diferentes coortes de predisposição a câncer (câncer de mama e câncer colorretal) detectaram a mesma microdeleção constitutiva rara em 9p21.3, abrangendo os genes *KIA1797* e *MIR491* (VENKATACHALAM et al. 2011; KREPISCHI et al. 2012c).

Em relação à síndrome do melanoma familiar, apenas um trabalho recentemente publicado (YANG et al. 2012) investigou CNVs germinativas em pacientes propensos a melanoma e sem mutações em *CDKN2A*, identificando uma duplicação de 257 Kb no cromossomo 4q13 em uma família (YANG et al. 2012). Essa duplicação genômica abrangia diversos genes da família de quimiocinas CXC, já descritas em células de melanoma atuando em aumento do crescimento tumoral, formação do tumor, potencial invasivo e metástase (BALENTIEN et al. 1991; VARNEY et al. 2003; BERTUCCI et al. 2007; LUKK et al. 2010).

Variações de número de cópias que afetam genes de predisposição a câncer estão associadas com o aumento do risco (SILVA et al. 2012; KREPISCHI et al. 2012a). Uma CNV pode atuar como uma mutação dominante, levando à manifestação do fenótipo sempre que presente, mas também pode ser um modificador de risco; um dos primeiros exemplos foi reportado por (Frank et al. 2007), que detectou efeito protetor contra a progressão do câncer de mama associado à deleção do exon 4 do gene *MTUS1*. Por outro lado, mutações germinativas em genes de câncer também estão, em alguns casos, associados a um perfil genômico diferencial de CNVs, como descrito para afetados pela Síndrome de Li-Fraumeni

portadores de mutações germinativas no gene supressor tumoral *TP53*; estes pacientes exibem um número de CNVs significativamente maior em comparação a controles (SHLIEN et al. 2008). Ainda nessa linha, trabalho recente detectou uma porcentagem acima do background de CNVs *de novo* nos pacientes de um estudo de 43 casos de câncer de células germinativas de testículo, sugerindo um novo mecanismo de predisposição a câncer (STADLER et al. 2012).

Do estudo de CNVs neste grupo brasileiro de pacientes de melanoma, apresentamos os dados em dois artigos científicos. O primeiro, já publicado, identificou duas alterações em um mesmo paciente, que desenvolveu melanoma e neoplasia intraepitelial de pâncreas. As alterações, bem como os genes contidos nos dois segmentos alterados, são discutidos no próprio artigo. Um fato relevante foi a detecção, em dos indivíduos avaliados, da perda total do cromossomo Y; este paciente foi diagnosticado com melanoma aos 78 anos. Aproximadamente 15% de homens com mais de 70 anos apresentam perda do cromossomo Y, fato restrito a apenas 4% em homens com idade inferior (DUMANSKI et al. 2015); nesse mesmo estudo, verificou-se que o uso de tabaco se associou à perda do cromossomo Y. O paciente de nossa coorte é ex-tabagista e o trabalho de Dumanski sugere que indivíduos tabagistas morreriam mais rápido que o resto da coorte estudada ou, então, que a perda do cromossomo Y é induzida e mantida pelo uso do cigarro, podendo ser um processo dinâmico e reversível. Com base nessas considerações, podemos sugerir que a idade pode ser um fator mais fortemente associado à perda de Y, mas que o uso do tabaco deve agir de maneira sinérgica. Outro ponto interessante é que, recentemente, um estudo com >8.000 amostras pareadas de tumor e tecido normal identificou dois potenciais genes supressores de tumor no cromossomo Y, os

genes *ZFY* e *UTY* (DAVOLI et al. 2013). Alguns estudos em apoio à presença de genes supressores tumorais no cromossomo Y mostram que a perda do Y na linhagem sanguínea em mosaico estaria associada ao desenvolvimento de tumores não-hematológicos em homens mais velhos, assim como a menor tempo de vida (FORSBERG et al. 2014).

O segundo trabalho derivado de nossos dados, realizado em coorte de 41 pacientes de melanoma familiar, identificou 10 CNVs germinativas raras em 9 dos indivíduos. Dentre os possíveis genes candidatos a moduladores de risco para o desenvolvimento de melanoma cutâneo identificados, podemos ressaltar o gene *PDE5A*, encontrado duplicado em um dos probandos, já foi visto com alta expressão em linhagens de célula de melanoma levando ao aumento do crescimento dessas células (MURATA et al. 2010).

A duplicação detectada em 8q23.1 contém o gene *ANGPT1*, que possui função importante na angiogênese. Embora *ANGPT1* já tenha sido observado alterado em outros tipos tumorais, outros estudos não identificaram a alteração na expressão desse gene durante a progressão da doença (GARDIZI et al. 2012). Entretanto, um estudo mostrou que a super-expressão de *ANGPT1* aumenta a capacidade metastática em células tumorais (HOLOPAINEN et al. 2009). Além disso, *ANGPT1* foi recentemente identificado como um gene importante em melanomas pelo estudo do TCGA (Cancer Genome Atlas Network 2015). Portanto, o papel de *ANGPT1* na suscetibilidade ao melanoma cutâneo merece ser melhor avaliado.

Outro gene importante identificado nas CNVs raras é *IDH1*, em nosso estudo presente em número de cópias diminuído (deleção de 146 Kb). Este gene, fortemente

associado ao desenvolvimento de gliomas, já havia sido associado a melanomas metastáticos e, recentemente, foi descrito como um gene “*driver*” em melanomas em estudo do TCGA (*The Cancer Genome Atlas*) (YAN et al. 2009; LOPEZ et al. 2010; Cancer Genome Atlas Network 2015).

O gene *SLC45A2* tem como função o transporte entre a membrana celular e é considerado um importante membro da via de pigmentação de pele por processar e transportar proteínas melanossomais como a tirosinase, por exemplo; variantes deste gene já foram associadas a maior suscetibilidade ao desenvolvimento de melanomas (IBARROLA-VILLAVA et al. 2011, 2012; READ et al. 2016). Identificamos em um paciente uma duplicação na região 12p12.3 contendo um gene dessa mesma família, o gene *SLC15A5*. Pouco se sabe sobre a função de *SLC15A5*, embora ele também esteja associado com atividade de transporte entre membranas (GeneCards.org).

Vários trabalhos já foram realizados em famílias de melanoma da população brasileira, buscando identificar mutações conhecidas em genes já descritos na literatura como de predisposição a melanoma, como *CDKN2A*, *CDK4*, *MITF*, *TERT* e *MC1R* (ASHTON-PROLLA et al. 2008; GRAZZIOTIN et al. 2013; DE ÁVILA et al. 2014; FIDALGO et al. 2014; PRAMIO et al. 2014). No estudo de exoma de um subgrupo de pacientes, negativos quanto estas mutações patogênicas, buscamos revelar novas variantes genômicas que pudessem compor o risco aumentado de predisposição desses indivíduos ao melanoma cutâneo. O sequenciamento de exoma foi realizado seguindo um modelo familiar, de dois casos por família: 10 indivíduos afetados, pertencentes a cinco diferentes famílias. A escolha do sequenciamento de exoma foi feita por ser uma abordagem robusta, que gera grande quantidade de dados em pouco tempo, fornecendo alta cobertura de sequências codificadoras, com custo e

complexidade menores quando comparados ao sequenciamento do genoma completo. A técnica de NGS (*Next Generation Sequencing*) tem sido muito eficaz na investigação de famílias com predisposição a algum tipo de câncer, que não possuem mutações em genes previamente descritos. Como exemplo, os genes *TERT*, *POT1* e *MITF* foram recentemente reportados pela técnica de NGS como genes de predisposição ao desenvolvimento de melanoma (YOKOYAMA et al. 2011; HORN et al. 2013; SHI et al. 2014).

Em nosso trabalho, consideramos apenas variantes genômicas confirmadas por boa cobertura vertical (mínimo de 20x), com alta qualidade de sequenciamento, frequência populacional menor que 0,1%, que estivessem em regiões exônicas (não-sinônimas) e co-segregassem no probando e seu respectivo parente afetado. Entretanto, visto que os bancos de dados de frequência populacional que utilizamos são em sua maioria europeus e norte-americanos, utilizamos também dados de sequenciamento de uma coorte de indivíduos sem câncer, pertencentes à população brasileira, a fim de excluir eventuais variantes populacionais.

Nas cinco famílias, foram identificadas 214 variantes raras não-sinônimas. Dentre elas, ocorreram principalmente mutações *missense* (92%), além de cinco mutações no promotor, 4 mutações *nonsense* (que acarreta ganho prematuro de *stop codon* na sequência de aminoácidos), 3 mutações *frameshift* (deslocamento do quadro de leitura) 2 variantes em sítios aceptores de *splicing* 1 deleção *inframe* e 1 *indel* acometendo 9 pares de base (deleção). Algumas das variantes raras identificadas no exoma afetam genes que já foram associados a um aumento de risco ao desenvolvimento de melanoma, como os genes *MYO7A* (rs41298135 – Família 2) e *WRN* (rs4987238 e rs140768346 – Famílias 3).

Algumas mutações no gene *MYO7A*, especificamente, podem causar o desenvolvimento da Síndrome de Usher tipo 1b, que se caracteriza por surdez, redução da função vestibular, e degeneração da retina. As miosinas são proteínas que possuem função importante no transporte e distribuição dos melanossomos. Em nosso estudo, o gene *MYO7A* apareceu relacionado a diversas funções nas redes geradas pelo software IPA como melanoma, câncer e degradação, localização e movimentos de melanossomos, o que mostra que esse gene pode ter uma grande importância na homeostase dos melanócitos. É importante mencionar que uma variante desse gene (rs2276288) já foi descrita como causadora de aumento de risco para melanoma (FERNANDEZ et al. 2009). Apesar da variante encontrada em nosso trabalho ser diferente (rs41298135), isso pode evidenciar que alterações nesse gene levam à alteração de sua função, acarretando aumento de suscetibilidade ao melanoma.

Duas variantes raras no gene *WRN* foram identificadas na Família 3 (rs4987238 – *allele frequency* 0,001924 e rs140768346 – *allele frequency* 0,002211). *WRN* é um gene da família de RecQ de helicases, que desempenha a função de manutenção da integridade genômica. Está associado à Síndrome de Werner, que é uma síndrome autossômica recessiva que se caracteriza por envelhecimento precoce e predisposição a câncer. Recentemente, duas diferentes variantes deste gene (rs4733225 e rs13251813) foram associadas ao aumento de risco em pacientes de famílias propensas a desenvolver melanoma (YANG et al. 2009), corroborando nossos achados.

Além desses dois genes de destaque, o grupo de genes identificados no exoma também se mostrou relevante tendo em vista que estão associados a fenótipos

de melanoma (*ITGA3*, *RECK*, *ADAMTS4*, *TYMP* e *MCM3*), pigmentação e pele (*COL4A2*, *HPS5*, *MLPH*, *VNN2*, *NID2*, *SLIT2* e *HMCN1*), além de suscetibilidade a câncer (*ZFHX3* e *CTBP2*). O gene *SLIT2* já foi associado com aumento de capacidade invasiva em outros tipos tumorais como gliomas e meduloblastomas, levando ao mesmo fenótipo em células tumorais de pele através da regulação do gene *MMP2* (WERBOWETSKI-OGILVIE et al. 2006; MERTSCH et al. 2008; QI et al. 2014).

Outro grupo de genes relevante foi evidenciado pela ferramenta VarElect: *CTBP2*, *MCM3*, *MYO7A*, *NID2* e *VNN2*. A variante encontrada no gene *CTBP2* (rs185994757 – Família 5) mostrou ser muito pouco frequente segundo dados do ExAC (*allele frequency* 0,003327). Este gene possui duas isoformas, uma delas com função de repressão de transcrição (GeneCards), tendo sido considerado um oncogene em tumores de ovário, visto que atua como supressor de *BRCA1* através de alterações epigenéticas e também promove proliferação celular em tumores de próstata via c-Myc (MAY et al. 2013; ZHANG et al. 2014). Além disso, a variante rs148636199 (*allele frequency* 0,00007424) no gene *MCM3* foi identificada na Família 3, a mesma família que possui alterações no gene *WRN*, como mencionado acima. O gene *MCM3* está envolvido na replicação genômica e está associado ao ciclo celular e mitose, que são funções essenciais para a manutenção celular. A alta expressão desse gene em melanomas já foi associada a baixa sobrevida livre de doença (NODIN et al. 2012).

Nenhuma das 214 variantes genômicas raras foi detectada na casuística de indivíduos brasileiros sem câncer, sugerindo que seriam também raras em nossa população.

7 CONCLUSÃO

Estudamos um grupo de 41 indivíduos não-relacionados afetados por melanoma, preenchendo critérios para síndrome do melanoma familiar, negativos quanto a mutações no gene principal de predisposição a melanoma cutâneo *CDKN2A*.

De maneira geral, nossos resultados sugerem que CNVs raras estão presentes em alguns desses pacientes e podem ser modeladores de risco para o desenvolvimento de melanomas. Entretanto, os genes aqui apontados, afetados por ganhos ou perdas no número de cópias, requerem mais estudo com relação a suas potenciais funções na melanomagenese. Embora as CNVs detectadas aqui sejam raras, devem ser testadas em coortes maiores de pacientes afetados por melanoma a fim de elucidar quais dos genes identificados têm, de fato, relevância para a suscetibilidade ao melanoma.

Adicionalmente, pelo sequenciamento de exoma de um subgrupo de dez pacientes pertencentes a cinco diferentes famílias de melanoma, identificamos variantes germinativas raras em genes que podem estar associados ao aumento de risco de desenvolvimento de melanoma cutâneo. Na análise aqui apresentada, foram priorizadas variantes não-sinônimas que segregassem nos pares de familiares afetados por melanoma e que apresentassem frequência inferior a 0,1% em bancos de dados de população geral. Além disso, diante da atual inexistência de um banco de dados com variantes da população brasileira, utilizamos também para consulta dados de exoma de um estudo independente de 20 indivíduos não afetados por câncer.

Dentre os genes identificados, ressaltamos a detecção de alguns já descritos na literatura como modeladores de risco para melanoma, como *MYO7A* e *WRN*. Além desses dois genes de destaque, o grupo de genes revelado no exoma também se mostrou relevante como um todo, tendo em vista que contém genes associados a fenótipos de melanoma (*ITGA3*, *RECK*, *ADAMTS4*, *TYMP* e *MCM3*), pigmentação e pele (*COL4A2*, *HPS5*, *MLPH*, *VNN2*, *NID2*, *SLIT2* e *HMCN1*), além de suscetibilidade a câncer (*ZFH3* e *CTBP2*). Parte dos genes revelados no estudo de exoma dessas famílias de melanoma cutâneo são bons candidatos para ampliar a pesquisa em coortes maiores de pacientes.

Este estudo identificou na população brasileira novos genes de suscetibilidade a melanoma cutâneo, contribuindo com vários candidatos potenciais a serem futuramente explorados.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aoude LG, Pritchard AL, Robles-Espinoza CD, et al. Nonsense mutations in the shelterin complex genes ACD and TERF2IP in familial melanoma. **J Natl Cancer Inst** 2014; 107. pii: dju408.

Aoude LG, Wadt KA, Pritchard AL, Hayward NK. Genetics of familial melanoma: 20 years after CDKN2A. **Pigment Cell Melanoma Res** 2015; 28:148-60.

Ashton-Prolla P, Bakos L, Junqueira G Jr, Giugliani R, Azevedo SJ, Hogg D. Clinical and molecular characterization of patients at risk for hereditary melanoma in southern Brazil. **J Invest Dermatol** 2008;128:421-5.

Azoury SC, Lange JR. Epidemiology, risk factors, prevention, and early detection of melanoma. **Surg Clin North Am** 2014; 94:945-62.

Balentien E, Mufson BE, Shattuck RL, Derynck R, Richmond A. Effects of MGSA/GRO alpha on melanocyte transformation. **Oncogene** 1991; 6:1115-24.

Barrett JH, Iles MM, Harland M, et al. Genome-wide association study identifies three new melanoma susceptibility loci. **Nat Genet** 2011; 43:1108-13.

Begg CB, Hummer A, Mujumdar U, et al. Familial aggregation of melanoma risks in a large population-based sample of melanoma cases. **Cancer Causes Control** 2004; 15:957-65.

Berger AH, Knudson AG, Pandolfi PP. A continuum model for tumour suppression. **Nature** 2011; 476:163-9.

Berger MF, Hodis E, Heffernan TP, et al. Melanoma genome sequencing reveals frequent PREX2 mutations. **Nature** 2012; 485:502-6.

Bertolotto C, Lesueur F, Giuliano S, et al. A SUMOylation-defective MITF germline mutation predisposes to melanoma and renal carcinoma. **Nature** 2011; 480:94-8.

Bertucci F, Pages C, Finetti P, et al. Gene expression profiling of human melanoma cell lines with distinct metastatic potential identifies new progression markers. **Anticancer Res** 2007; 27:3441-9.

Besaratinia A, Pfeifer GP. Sunlight ultraviolet irradiation and BRAF V600 mutagenesis in human melanoma. **Hum Mutat** 2008; 29:983-91.

Bevona C, Goggins W, Quinn T, Fullerton J, Tsao H. Cutaneous melanomas associated with nevi. **Arch Dermatol** 2003; 139:1620-4; discussion 1624.

Bis S, Tsao H. Melanoma genetics: the other side. **Clin Dermatol** 2013; 31:148-55.

Bishop DT, Demenais F, Goldstein AM, et al. Geographical variation in the penetrance of CDKN2A mutations for melanoma. **J Natl Cancer Inst** 2002; 94:894-903.

Bishop DT, Demenais F, Iles MM, et al. Genome-wide association study identifies three loci associated with melanoma risk. **Nat Genet** 2009; 41:920-5.

Cancer Genome Atlas Network. Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. **Cell** 2015; 161:1681-96.

Cazier JB, Tomlinson I. General lessons from large-scale studies to identify human cancer predisposition genes. **J Pathol** 2010; 220:255-62.

Clark WH Jr, Elder DE, Guerry D 4th, Epstein MN, Greene MH, Van Horn M. A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. **Hum Pathol** 1984; 15:1147-65.

Codd V, Nelson CP, Albrecht E, et al. Identification of seven loci affecting mean telomere length and their association with disease. **Nat Genet** 2013; 45:422-7, 427e1-2.

Cui R, Widlund HR, Feige E, et al. Central role of p53 in the suntan response and pathologic hyperpigmentation. **Cell** 2007; 128:853-64.

Davies H, Bignell GR, Cox C, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. **Nature** 2002; 417:949-54.

Davoli T, Xu AW, Mengwasser KE, et al. Cumulative haploinsufficiency and triplosensitivity drive aneuploidy patterns and shape the cancer genome. **Cell** 2013; 155:948-62.

de Ávila AL, Krepischi AC, Moredo LF, et al. Germline CDKN2A mutations in Brazilian patients of hereditary cutaneous melanoma. **Fam Cancer** 2014; 13:645-9.

Dumanski JP, Rasi C, Lönn M, et al. Mutagenesis. Smoking is associated with mosaic loss of chromosome Y. **Science** 2015; 347:81-3.

Escaramís G, Docampo E, Rabionet R. A decade of structural variants: description, history and methods to detect structural variation. **Brief Funct Genomics** 2015; 14:305-14.

Eskandarpour M, Kiaii S, Zhu C, Castro J, Sakko AJ, Hansson J. Suppression of oncogenic NRAS by RNA interference induces apoptosis of human melanoma cells. **Int J Cancer** 2005; 115:65-73.

Falchi M, Bataille V, Hayward NK, et al. Genome-wide association study identifies variants at 9p21 and 22q13 associated with development of cutaneous nevi. **Nat Genet** 2009; 41:915-9.

Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **Int J Cancer** 2015; 136:E359-86.

Fernandez LP, Milne RL, Pita G, et al. Pigmentation-related genes and their implication in malignant melanoma susceptibility. **Exp Dermatol** 2009; 18:634-42.

Fidalgo F, Gomes EE, Moredo Facure L, et al. Association of melanoma with intraepithelial neoplasia of the pancreas in three patients. **Exp Mol Pathol** 2014; 97:144-7.

Fitzgerald MG, Harkin DP, Silva-Arrieta S, et al. Prevalence of germ-line mutations in p16, p19ARF, and CDK4 in familial melanoma: analysis of a clinic-based population. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1996; 93:8541-5.

Forbes SA, Tang G, Bindal N, et al. COSMIC (the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer): a resource to investigate acquired mutations in human cancer. **Nucleic Acids Res** 2010; 38:D652-7.

Ford D, Bliss JM, Swerdlow AJ, et al. Risk of cutaneous melanoma associated with a family history of the disease. The International Melanoma Analysis Group (IMAGE). **Int J Cancer** 1995; 62:377-81.

Forsberg LA, Rasi C, Malmqvist N, et al. Mosaic loss of chromosome Y in peripheral blood is associated with shorter survival and higher risk of cancer. **Nat Genet** 2014; 46:624-8.

Fresno Vara JA, Casado E, de Castro J, Cejas P, Belda-Iniesta C, González-Barón M. PI3K/Akt signalling pathway and cancer. **Cancer Treat Rev** 2004; 30:193-204.

Friedman JM, Baross A, Delaney AD, et al. Oligonucleotide microarray analysis of genomic imbalance in children with mental retardation. **Am J Hum Genet** 2006; 79:500-13.

Fung YK, Murphree AL, T'Ang A, Qian J, Hinrichs SH, Benedict WF. Structural evidence for the authenticity of the human retinoblastoma gene. **Science** 1987; 236:1657-61.

Garber JE, Offit K. Hereditary cancer predisposition syndromes. **J Clin Oncol** 2005; 23:276-92.

Gardizi M, Kurschat C, Riese A, et al. A decreased ratio between serum levels of the antagonistic angiopoietins 1 and 2 indicates tumour progression of malignant melanoma. **Arch Dermatol Res** 2012; 304:397-400.

Gariyban L, Fisher DE. How sunlight causes melanoma. **Curr Oncol Rep** 2010; 12:319-26.

GENECARDS. **CDKN2A gene**. Available from: <<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CDKN2A&keywords=CDKN2A>>. [2015 jun 15]

Giles N, Pavey S, Pinder A, Gabrielli B. Multiple melanoma susceptibility factors function in an ultraviolet radiation response pathway in skin. **Br J Dermatol** 2012; 166:362-71.

Goldstein AM, Chan M, Harland M, et al. High-risk melanoma susceptibility genes and pancreatic cancer, neural system tumors, and uveal melanoma across GenoMEL. **Cancer Res** 2006; 66:9818-28.

Goldstein AM, Chan M, Harland M, et al. Features associated with germline CDKN2A mutations: a GenoMEL study of melanoma-prone families from three continents. **J Med Genet** 2007; 44:99-106.

Grazziotin TC, Rey MC, Bica CG, et al. Genetic variations of patients with familial or multiple melanoma in Southern Brazil. **J Eur Acad Dermatol Venereol** 2013; 27:e179-85.

Guo H, German P, Bai S, et al. The PI3K/AKT Pathway and Renal Cell Carcinoma. **J Genet Genomics** 2015; 42:343-53.

Hampel H, Bennett RL, Buchanan A, et al. A practice guideline from the American College of Medical Genetics and Genomics and the National Society of Genetic Counselors: referral indications for cancer predisposition assessment. **Genet Med** 2015; 17:70-87.

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

Hansen CB, Wadge LM, Lowstuter K, Boucher K, Leachman SA. Clinical germline genetic testing for melanoma. **Lancet Oncol** 2004; 5:314-9.

Hansson J. Familial cutaneous melanoma. **Adv Exp Med Biol** 2010; 685:134-45.

Harbour JW, Onken MD, Roberson ED, et al. Frequent mutation of BAP1 in metastasizing uveal melanomas. **Science** 2010; 330:1410-3.

Hingorani SR, Jacobetz MA, Robertson GP, Herlyn M, Tuveson DA. Suppression of BRAF(V599E) in human melanoma abrogates transformation. **Cancer Res** 2003; 63:5198-202.

Hodis E, Watson IR, Kryukov GV, et al. A landscape of driver mutations in melanoma. **Cell** 2012; 150:251-63.

Hoeflich KP, Gray DC, Eby MT, et al. Oncogenic BRAF is required for tumor growth and maintenance in melanoma models. **Cancer Res** 2006; 66:999-1006.

Holopainen T, Huang H, Chen C, et al. Angiopoietin-1 overexpression modulates vascular endothelium to facilitate tumor cell dissemination and metastasis establishment. **Cancer Res** 2009; 69:4656-64.

Horn S, Figl A, Rachakonda PS, et al. TERT promoter mutations in familial and sporadic melanoma. **Science** 2013; 339:959-61.

Huff V. Wilms' tumours: about tumour suppressor genes, an oncogene and a chameleon gene. **Nat Rev Cancer** 2011; 11:111-21.

Hussussian CJ, Struewing JP, Goldstein AM, et al. Germline p16 mutations in familial melanoma. **Nat Genet** 1994; 8:15-21.

Ibarrola-Villava M, Fernandez LP, Alonso S, et al. A customized pigmentation SNP array identifies a novel SNP associated with melanoma predisposition in the SLC45A2 gene. **PLoS One** 2011; 6:e19271.

Ibarrola-Villava M, Hu HH, Guedj M, et al. MC1R, SLC45A2 and TYR genetic variants involved in melanoma susceptibility in southern European populations: results from a meta-analysis. **Eur J Cancer** 2012; 48:2183-91.

Iles MM, Bishop DT, Taylor JC, et al. The effect on melanoma risk of genes previously associated with telomere length. **J Natl Cancer Inst** 2014; 106. pii: dju267.

Jackson S, Harland M, Turner F, et al. No Evidence for BRAF as a melanoma/nevus susceptibility gene. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2005; 14:913-8.

Ji Z, Flaherty KT, Tsao H. Molecular therapeutic approaches to melanoma. **Mol Aspects Med** 2010; 31:194-204.

Kamb A, Shattuck-Eidens D, Eeles R, et al. Analysis of the p16 gene (CDKN2) as a candidate for the chromosome 9p melanoma susceptibility locus. **Nat Genet** 1994; 8:23-6.

Kennedy C, ter Huurne J, Berkhout M, et al. Melanocortin 1 receptor (MC1R) gene variants are associated with an increased risk for cutaneous melanoma which is largely independent of skin type and hair color. **J Invest Dermatol** 2001; 117:294-300.

Kim KB, Alrwas A. Treatment of KIT-mutated metastatic mucosal melanoma. **Chin Clin Oncol** 2014; 3:35.

- Ko JM, Velez NF, Tsao H. Pathways to melanoma. **Semin Cutan Med Surg** 2010; 29:210-7.
- Krepischi AC, Pearson PL, Rosenberg C. Germline copy number variations and cancer predisposition. **Future Oncol** 2012a; 8:441-50.
- Krepischi AC, Capelli LP, Carvalho FF, Heck B, de Camargo B, Rosenberg C. A de novo em 1.3 Mb microdeletion at 17q11.2 associated with neurofibromatosis-Noonan syndrome. **Appl Cancer Res** 2012b; 32:153-5.
- Krepischi AC, Achatz MI, Santos EM, et al. Germline DNA copy number variation in familial and early-onset breast cancer. **Breast Cancer Res** 2012c; 14:R24.
- Krepischi-Santos AC, Vianna-Morgante AM, Jehee FS, et al. Whole-genome array-CGH screening in undiagnosed syndromic patients: old syndromes revisited and new alterations. **Cytogenet Genome Res** 2006; 115:254-61.
- 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.
- Law MH, Bishop DT, Lee JE, et al. Genome-wide meta-analysis identifies five new susceptibility loci for cutaneous malignant melanoma. **Nat Genet** 2015; 47:987-95.
- Lee AS, Gutiérrez-Arcelus M, Perry GH, et al. Analysis of copy number variation in the rhesus macaque genome identifies candidate loci for evolutionary and human disease studies. **Hum Mol Genet** 2008; 17:1127-36.
- Lesnik Oberstein SA, Kriek M, White SJ, et al. Peters Plus syndrome is caused by mutations in B3GALTL, a putative glycosyltransferase. **Am J Hum Genet** 2006; 79:562-6.
- Levi F, Te VC, Randimbison L, La Vecchia C. Cancer risk in women with previous breast cancer. **Ann Oncol** 2003; 14:71-3.
- Li W, Olivier M. Current analysis platforms and methods for detecting copy number variation. **Physiol Genomics** 2013; 45:1-16.
- Li WQ, Qureshi AA, Ma J, et al. Personal history of prostate cancer and increased risk of incident melanoma in the United States. **J Clin Oncol** 2013; 31:4394-9.
- Liao YP, Chen LY, Huang RL, et al. Hypomethylation signature of tumor-initiating cells predicts poor prognosis of ovarian cancer patients. **Hum Mol Genet** 2014; 23:1894-906.
- Lin JY, Fisher DE. Melanocyte biology and skin pigmentation. **Nature** 2007; 445:843-50.

Lo JA, Fisher DE. The melanoma revolution: from UV carcinogenesis to a new era in therapeutics. **Science** 2014; 346:945-9.

Loayza D, De Lange T. POT1 as a terminal transducer of TRF1 telomere length control. **Nature** 2003; 423:1013-8.

Lopez GY, Reitman ZJ, Solomon D, et al. IDH1(R132) mutation identified in one human melanoma metastasis, but not correlated with metastases to the brain. **Biochem Biophys Res Commun** 2010; 398:585-7.

Lucito R, Suresh S, Walter K, et al. Copy-number variants in patients with a strong family history of pancreatic cancer. **Cancer Biol Ther** 2007; 6:1592-9.

Lukk M, Kapushesky M, Nikkilä J, et al. A global map of human gene expression. **Nat Biotechnol** 2010; 28:322-4.

Marks MS, Seabra MC. The melanosome: membrane dynamics in black and white. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2001; 2:738-48.

Marzuka-Alcalá A, Gabree MJ, Tsao H. Melanoma susceptibility genes and risk assessment. **Methods Mol Biol** 2014; 1102:381-93.

Mavaddat N, Barrowdale D, Andrulis IL, et al. Pathology of breast and ovarian cancers among BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from the Consortium of Investigators of Modifiers of BRCA1/2 (CIMBA). **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2012; 21:134-47

Mertsch S, Schmitz N, Jeibmann A, Geng JG, Paulus W, Senner V. Slit2 involvement in glioma cell migration is mediated by Robo1 receptor. **J Neurooncol** 2008; 87:1-7.

Miller AJ, Mihm MC Jr. Melanoma. **N Engl J Med** 2006; 355:51-65.

Mitra D, Luo X, Morgan A, Wang J, et al. An ultraviolet-radiation-independent pathway to melanoma carcinogenesis in the red hair/fair skin background. **Nature** 2012; 491:449-53.

Miyake Y, Nakamura M, Nabetani A, et al. RPA-like mammalian Ctc1-Stn1-Ten1 complex binds to single-stranded DNA and protects telomeres independently of the Pot1 pathway. **Mol Cell** 2009; 36:193-206

Moredo LF. **Caracterização fenotípica de pacientes portadores de melanoma com síndrome do melanoma familiar**. São Paulo; 2012. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Murata T, Shimizu K, Watanabe Y, Morita H, Sekida M, Tagawa T. Expression and role of phosphodiesterase 5 in human malignant melanoma cell line. **Anticancer Res** 2010; 30:355-8.

- Måsbäck A, Olsson H, Westerdahl J, et al. Clinical and histopathological features of malignant melanoma in germline CDKN2A mutation families. **Melanoma Res** 2002; 12:549-57.
- May T, Yang J, Shoni M, et al. BRCA1 expression is epigenetically repressed in sporadic ovarian cancer cells by overexpression of C-terminal binding protein 2. **Neoplasia** 2013; 15:600-8.
- Nagy R, Sweet K, Eng C. Highly penetrant hereditary cancer syndromes. **Oncogene** 2004; 23:6445-70.
- Niihori T, Aoki Y, Narumi Y, et al. Germline KRAS and BRAF mutations in cardio-facio-cutaneous syndrome. **Nat Genet** 2006; 38:294-6.
- Nikolaev SI, Rimoldi D, Iseli C, et al. Exome sequencing identifies recurrent somatic MAP2K1 and MAP2K2 mutations in melanoma. **Nat Genet** 2011; 44:133-9.
- Nodin B, Fridberg M, Jonsson L, Bergman J, Uhlén M, Jirstrom K. High MCM3 expression is an independent biomarker of poor prognosis and correlates with reduced RBM3 expression in a prospective cohort of malignant melanoma. **Diagn Pathol** 2012;7:82.
- Palm W, de Lange T. How shelterin protects mammalian telomeres. **Annu Rev Genet** 2008; 42:301-34.
- Parker JF, Florell SR, Alexander A, DiSario JA, Shami PJ, Leachman SA. Pancreatic carcinoma surveillance in patients with familial melanoma. **Arch Dermatol** 2003; 139:1019-25.
- Patton EE, Widlund HR, Kutok JL, et al. BRAF mutations are sufficient to promote nevi formation and cooperate with p53 in the genesis of melanoma. **Curr Biol** 2005; 15:249-54.
- Pleasance ED, Cheetham RK, Stephens PJ, et al. A comprehensive catalogue of somatic mutations from a human cancer genome. **Nature** 2010; 463:191-6.
- Pollock PM, Harper UL, Hansen KS, et al. High frequency of BRAF mutations in nevi. **Nat Genet** 2003; 33:19-20.
- Pramio DT, Aguiar T, Araujo ESSD, et al. Low Frequency of Germline TERT and MITF Mutations in Brazilian Melanoma- Prone Patients. **Hereditary Genet** 2014; 3:3.
- Qi C, Lan H, Ye J, et al. Slit2 promotes tumor growth and invasion in chemically induced skin carcinogenesis. **Lab Invest** 2014; 94:766-76.

Rahman N, Scott RH. Cancer genes associated with phenotypes in monoallelic and biallelic mutation carriers: new lessons from old players. **Hum Mol Genet** 2007; 16 Spec No 1:R60-6.

Rahman N, Seal S, Thompson D, et al. PALB2, which encodes a BRCA2-interacting protein, is a breast cancer susceptibility gene. **Nat Genet** 2007; 39:165-7.

Rahman N. Realizing the promise of cancer predisposition genes. **Nature** 2014; 505:302-8.

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

Raimondi S, Sera F, Gandini S, Iodice S, Caini S, Maisonneuve P, Fagnoli MC. MC1R variants, melanoma and red hair color phenotype: a meta-analysis. **Int J Cancer** 2008; 122:2753-60.

Rasheed S, Mao Z, Chan JM, Chan LS. Is Melanoma a stem cell tumor? Identification of neurogenic proteins in trans-differentiated cells. **J Transl Med** 2005; 3:14.

Read J, Wadt KA, Hayward NK. Melanoma genetics. **J Med Genet** 2016; 53:1-14.

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

Rees JL. Genetics of hair and skin color. **Annu Rev Genet** 2003;37:67-90.

Rhodes AR, Weinstock MA, Fitzpatrick TB, Mihm MC Jr, Sober AJ. Risk factors for cutaneous melanoma. A practical method of recognizing predisposed individuals. **JAMA** 1987; 258:3146-54.

Robles-Espinoza CD, Harland M, Ramsay AJ, et al. POT1 loss-of-function variants predispose to familial melanoma. **Nat Genet** 2014; 46:478-81.

Rustgi AK. Familial pancreatic cancer: genetic advances. *Genes Dev.* 2014; 28:1-7.
Sahin F, Maitra A, Argani P, Sato N, Maehara N, Montgomery E, Goggins M, Hruban RH, Su GH. Loss of Stk11/Lkb1 expression in pancreatic and biliary neoplasms. **Mod Pathol** 2003; 16:686-91.

Sebat J, Lakshmi B, Troge J, et al. Large-scale copy number polymorphism in the human genome. **Science** 2004; 305:525-8.

[SEER] Surveillance, Epidemiology, and End Results Program. **SEER stat fact sheets: melanoma of the skin.** 2005-2011. Available from: <<http://seer.cancer.gov/statfacts/html/melan.html>> [2015 mai 27].

Shaw-Smith C, Pittman AM, Willatt L, et al. Microdeletion encompassing MAPT at chromosome 17q21.3 is associated with developmental delay and learning disability. **Nat Genet** 2006; 38:1032-7.

Shi J, Yang XR, Ballew B, et al. Rare missense variants in POT1 predispose to familial cutaneous malignant melanoma. **Nat Genet** 2014; 46:482-6.

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.

Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. **CA Cancer J Clin** 2016; 66:7-30.

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

Sini MC, Manca A, Cossu A, et al. Molecular alterations at chromosome 9p21 in melanocytic naevi and melanoma. **Br J Dermatol** 2008; 158:243-50.

Slater HR, Bailey DK, Ren H, et al. Analysis of SNP content of 82 common copy-number polymorphisms from the Database of Genomic Variations. **Am J Hum Genet** 2006; 78:730-1.

Smith MJ, O'Sullivan J, Bhaskar SS, et al. Loss-of-function mutations in SMARCE1 cause an inherited disorder of multiple spinal meningiomas. **Nat Genet** 2013; 45:295-8.

Stadler ZK, Esposito D, Shah S, et al. Rare de novo germline copy-number variation in testicular cancer. **Am J Hum Genet** 2012; 91:379-83.

Stahl JM, Sharma A, Cheung M, et al. Deregulated Akt3 activity promotes development of malignant melanoma. **Cancer Res** 2004; 64:7002-10.

Tsao H, Bevona C, Goggins W, Quinn T. The transformation rate of moles (melanocytic nevi) into cutaneous melanoma: a population-based estimate. **Arch Dermatol** 2003; 139:282-8.

Tucker MA, Boice JD Jr, Hoffman DA. Second cancer following cutaneous melanoma and cancers of the brain, thyroid, connective tissue, bone, and eye in Connecticut, 1935-82. **Natl Cancer Inst Monogr** 1985; 68:161-89.

Valverde P, Healy E, Jackson I, Rees JL, Thody AJ. Variants of the melanocyte-stimulating hormone receptor gene are associated with red hair and fair skin in humans. **Nat Genet** 1995; 11:328-30.

- van den Hurk K, Niessen HE, Veeck J, et al. Genetics and epigenetics of cutaneous malignant melanoma: a concert out of tune. **Biochim Biophys Acta** 2012; 1826:89-102.
- Van Raamsdonk CD, Bezrookove V, Green G, et al. Frequent somatic mutations of GNAQ in uveal melanoma and blue naevi. **Nature** 2009; 457:599-602.
- Varney ML, Li A, Dave BJ, Bucana CD, Johansson SL, Singh RK. Expression of CXCR1 and CXCR2 receptors in malignant melanoma with different metastatic potential and their role in interleukin-8 (CXCL-8)-mediated modulation of metastatic phenotype. **Clin Exp Metastasis** 2003; 20:723-31.
- Venkatachalam R, Verwiel ET, Kamping EJ, et al. Identification of candidate predisposing copy number variants in familial and early-onset colorectal cancer patients. **Int J Cancer** 2011; 129:1635-42.
- Vissers LE, van Ravenswaaij CM, Admiraal R, et al. Mutations in a new member of the chromodomain gene family cause CHARGE syndrome. **Nat Genet** 2004; 36:955-7.
- Ward KA, Lazovich D, Hordinsky MK. Germline melanoma susceptibility and prognostic genes: a review of the literature. **J Am Acad Dermatol** 2012; 67:1055-67.
- Watson CT, Marques-Bonet T, Sharp AJ, Mefford HC. The genetics of microdeletion and microduplication syndromes: an update. **Annu Rev Genomics Hum Genet** 2014; 15:215-44.
- Werbowetski-Ogilvie TE, Seyed Sadr M, Jabado N, et al. Inhibition of medulloblastoma cell invasion by Slit. **Oncogene** 2006; 25:5103-12.
- Whitcomb DC, Gorry MC, Preston RA, et al. Hereditary pancreatitis is caused by a mutation in the cationic trypsinogen gene. **Nat Genet** 1996; 14:141-5.
- Wiesner T, Obenaus AC, Murali R, et al. Germline mutations in BAP1 predispose to melanocytic tumors. **Nat Genet** 2011; 43:1018-21.
- Williams PF, Olsen CM, Hayward NK, Whiteman DC. Melanocortin 1 receptor and risk of cutaneous melanoma: a meta-analysis and estimates of population burden. **Int J Cancer** 2011; 129:1730-40.
- Yan H, Parsons DW, Jin G, et al. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. **N Engl J Med** 2009; 360:765-73.
- Yang XR, Pfeiffer RM, Wheeler W, Yeager M, Chanock S, Tucker MA, Goldstein AM. Identification of modifier genes for cutaneous malignant melanoma in melanoma-prone families with and without CDKN2A mutations. **Int J Cancer** 2009; 125:2912-7.

Yang XR, Brown K, Landi MT, et al. Duplication of CXC chemokine genes on chromosome 4q13 in a melanoma-prone family. **Pigment Cell Melanoma Res** 2012; 25:243-7.

Yeh ET. Microphthalmia-associated transcription factor, melanoma, and renal carcinoma: the small ubiquitin-like modifier connection. **Pigment Cell Melanoma Res** 2011; 24:1079-80.

Yokoyama S, Woods SL, Boyle GM, et al. A novel recurrent mutation in MITF predisposes to familial and sporadic melanoma. **Nature** 2011; 480:99-103.

Zhang B, Kirov S, Snoddy J. WebGestalt: an integrated system for exploring gene sets in various biological contexts. **Nucleic Acids Res** 2005; 33:W741-8.

Zhang C, Gao C, Xu Y, Zhang Z. CtBP2 could promote prostate cancer cell proliferation through c-Myc signaling. **Gene** 2014; 546:73-9.

Zuo L, Weger J, Yang Q, et al. Germline mutations in the p16INK4a binding domain of CDK4 in familial melanoma. **Nat Genet** 1996; 12:97-9.

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



Centro de Tratamento, Ensino e Pesquisa em Câncer

Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP

São Paulo, 11 de janeiro de 2013.

A
Dra. Ana Cristina Victorino Krepisch.

Aluno: Felipe Fidalgo de Carvalho (Doutorado).

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1728/12
“Investigação de fatores genéticos na etiologia da síndrome do melanoma familiar: avaliação de copy number variation (CNV) e sequenciamento do exoma”.

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 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 coordenador do projeto INCITO (Prof. Dr. Luiz Paulo Kowalski) autorizando o uso da verba correspondente para o desenvolvimento do presente projeto;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Câncer de Pele e Dermatologia do Hospital AC Camargo;
- Declaração de Ciência e Comprometimento 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 Fróes Marques Campos
2º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

1/1

Anexo 2 - Detalhes clínicos do grupo de 41 pacientes de melanoma negativos para mutações em *CDKN2A*, *CDK4*, *TERT* e *MITF*

Paciente	Gênero ¹	Idade ao diagnóstico	Critério clínico ²	Nº de melanomas	Tipos dos melanomas	Outro cancer (idade)
8	F	51	Familiar	1	Melanoma extensivo superficial	Reto (58)
11	M	51	Familiar	1	Melanoma extensivo superficial	Próstata (61) Carcinoma de intestine delgado (67)
12	F	43	Familiar	1	Melanoma extensivo superficial	-
13	M	55	Familiar	1	Melanoma extensivo superficial	-
14	F	42	Familiar	1	Melanoma extensivo superficial	-
15	F	28	Familiar	1	Melanoma extensivo superficial	-
16	F	64	Familiar	1	Melanoma extensivo superficial	Carcinoma de células escamosas (67)
20	F	50	Familiar	1	Melanoma extensivo superficial	Carcinoma de células basais (51, 52*) Carcinoma de células escamosas (62)
26	M	53	Familiar	1	Melanoma extensivo superficial	-
31	F	30	Familiar	1	n/a	-
32	F	51	Familiar	1	Melanoma <i>in situ</i>	-
38	F	49	Familiar	1	Melanoma extensivo superficial	-
41	M	46	Familiar	1	Melanoma <i>in situ</i>	-
42	F	45	Familiar	1	Melanoma extensivo superficial	-
45	F	56	Familiar	1	n/a	-
49	F	44	Familiar	1	Melanoma extensivo superficial	Carcinoma de células basais (48)
57	F	34	Familiar	1	n/a	-
65	M	39	Familiar	1	Melanoma extensivo superficial	Carcinoma de células basais (39)
66	F	49	Familiar	1	Melanoma extensivo superficial	-
67	F	69	Familiar	2	Melanoma extensivo superficial	Carcinoma espinocelular (70) Carcinoma basocelular (n/a) Carcinoma lobular da mama (63)
68	M	44	Familiar	1	Melanoma extensivo superficial	-
2	F	31	F / MPM	5	Melanoma extensivo superficial	-
23	M	47	F / MPM	2	Melanoma <i>in situ</i>	-
27	F	53	F / MPM	2	Melanoma extensivo superficial	-
28	M	37	F / MPM	2	Melanoma extensivo superficial	-
40	M	59	F / MPM	7	Melanoma extensivo superficial	Carcinoma de células basais (59)
52	M	38	F / MPM	2	n/a	-
60	M	63	F / MPM	2	Melanoma <i>in situ</i>	-
10	M	44	Melanomas primários múltiplos	2	Melanoma <i>in situ</i>	-

19	M	34	Melanomas primários múltiplos	2	Melanoma extensivo superficial	-
21	M	56	Melanomas primários múltiplos	2	Melanoma extensivo superficial	Carcinoma de células basais (57, 58, 59)
22	F	30	Melanomas primários múltiplos	2	Melanoma extensivo superficial	Carcinoma de tireóide (38) Carcinoma de células basais (42)
29	M	33	Melanomas primários múltiplos	2	Melanoma extensivo superficial e Melanoma <i>in situ</i>	-
35	M	67	Melanomas primários múltiplos	4	n/a	Carcinoma de células basais (67, 71, 73, 74*) Carcinoma de células escamosas (74, 75)
39	F	75	Melanomas primários múltiplos	5	Melanoma extensivo superficial	Carcinoma de células basais (79, 85)
43	F	62	Melanomas primários múltiplos	4	n/a	-
53	F	25	Melanomas primários múltiplos	2	Melanoma extensivo superficial e Melanoma <i>in situ</i>	-
55	F	22	Melanomas primários múltiplos	5	Melanoma extensivo superficial e Melanoma <i>in situ</i>	Carcinoma de tireóide (41) Carcinoma de células basais (42)
64	M	41	Melanomas primários múltiplos	2	Melanoma extensivo superficial e Melanoma amelanótico	Carcinoma de células basais (49)
69	M	51	Melanomas primários múltiplos	4	Melanoma extensivo superficial e Melanoma <i>in situ</i>	-
70	F	15	Melanomas primários múltiplos	3	Melanoma extensivo superficial e Melanoma <i>in situ</i>	-

¹F – feminino, M – masculino; ²F – familiar, MPM – melanomas primários múltiplos; *Este paciente desenvolveu dois carcinomas de células basais na mesma idade; **Este paciente desenvolveu quarto carcinomas de células basais na mesma idade; n/a – dados não disponíveis.

Anexo 3 - Variantes raras germinativas identificadas por sequenciamento de exoma nos 5 pares de pacientes afetados por melanoma.

Famílias	Genes	dbSNP	Variantes preditas como patogênicas	Posição genômica	RefSeq	Tipo de variante	Genótipo	Éxon	OMIM?	Códon afetado	AA afetado	Frequência ExAC
Família 1	<i>ANKRD37</i>	rs115813463	3 of 5 Predicted as Damaging	4:186318377	NM_181726.2	Missense	C_T	2	Não	c.101C>T	p.Pro34Leu	0.000745
	<i>APC2</i>	rs143295265	2 of 5 Predicted as Damaging	19:1455153	NM_005883.2	Missense	C_T	5	Sim	c.419T>C	p.Phe140Ser	0.002609
	<i>BAZZA</i>	rs202169462	0 of 5 Predicted as Damaging	12:56995907	NM_013449.3	Missense	A_G	20	Sim	c.3500C>T	p.Ala1167Val	0.0004749
	<i>C1orf112</i>	rs138421783	0 of 5 Predicted as Damaging	1:169806228	NM_018186.2	Missense	A_G	17	Não	c.1700G>A	p.Arg567His	0.001652
	<i>C1orf159</i>	rs75079403	0 of 5 Predicted as Damaging	1:1025751	NM_017891.4	Missense	C_T	4	Não	c.130G>A	p.Ala44Thr	0.0004803
	<i>C7orf34</i>	rs145921401	0 of 5 Predicted as Damaging	7:142636783	NM_178829.4	Missense	A_G	1	Não	c.140A>G	p.Gln47Arg	0.0003552
	<i>CCDC135</i>	rs114195136	4 of 5 Predicted as Damaging	16:57758736	NM_032269.5	Missense	C_T	13,11,12	Não	c.1747C>T	p.Arg583Trp	0.004648
	<i>CCDC81</i>	rs145739398	0 of 5 Predicted as Damaging	11:86126162	NM_001156474	Missense	C_G	13,12	Não	c.1498C>G	p.Pro500Ala	0.0007112
	<i>CD3EAP</i>	rs117289933	2 of 5 Predicted as Damaging	19:45910365	NM_012099.1	Missense	C_G	2	Sim	c.36C>G	p.Phe12Leu	0.00109
	<i>COL4A2</i>	rs202017641	1 of 5 Predicted as Damaging	13:111109725	NM_001846.2	Missense	A_G	21	Sim	c.1375G>A	p.Ala459Thr	0.002116
	<i>DDO</i>	rs150069463	1 of 5 Predicted as Damaging	6:110714040	NM_003649	Missense	C_T	5,4	Sim	c.1048G>A	p.Ala350Thr	0.001066
	<i>DSC3</i>	rs141311997	2 of 5 Predicted as Damaging	18:28574450	NM_001941	Missense	C_T	16	Sim	c.2494-112G>A	p.Gly211Arg	0.002214
	<i>DUSP27</i>	rs138472448	4 of 5 Predicted as Damaging	1:167096982	NM_001080426.1	Missense	A_G	5	Não	c.2614A>G	p.Lys872Glu	0.003543
	<i>EEA1</i>	rs145270378	1 of 5 Predicted as Damaging	12:93196194	NM_003566.3	Missense	C_T	19	Sim	c.2656G>A	p.Ala886Thr	0.001211
	<i>FAM221A</i>	Ausente no dbSNP	n/a	7:23731209	n/a	Frameshift	-_G	4,3	Não	n/a	n/a	n/a
	<i>FOXII</i>	rs115399307	2 of 5 Predicted as Damaging	5:169535155	NM_012188.4	Missense	C_T	2	Sim	c.677C>T	p.Thr226Ile	0.004185
	<i>GAL3ST4</i>	rs142988850	3 of 5 Predicted as Damaging	7:99764240	NM_024637.4	Missense	A_G	3	Sim	c.314T>C	p.Phe105Ser	0.002019
	<i>GPR128</i>	Ausente no dbSNP	n/a	3:100378552	n/a	Frameshift	-_A	14	Sim	n/a	n/a	n/a
	<i>ITGA3</i>	rs140248487	2 of 5 Predicted as Damaging	17:48156540	NM_005501.2	Missense	C_T	20	Sim	c.2501C>T	p.Thr834Met	0.0003789
	<i>KCNK5</i>	rs41273124	3 of 5 Predicted as Damaging	6:39159072	NM_003740.3	Missense	A_T	5	Sim	c.1094A>T	p.Lys365Ile	0.001629
	<i>KMT2E</i>	rs151289792	3 of 5 Predicted as Damaging	7:104747094	NM_018682.3	Missense	C_T	19,20	Sim	c.2722C>T	p.Pro908Ser	0.001697
	<i>MGAT3</i>	rs141441163	1 of 5 Predicted as Damaging	22:39884847	NM_002409.4	Missense	C_G	2,1	Sim	c.1495G>C	p.Asp499His	0.00439
	<i>MKS1</i>	rs142813109	1 of 5 Predicted as Damaging	17:56294075	NM_017777.3	Missense	C_G	3	Sim	c.213C>G	p.Asp71Glu	0.003309
	<i>MPHOSPH9</i>	rs145677970	0 of 5 Predicted as Damaging	12:123682864	NM_022782.3	Missense	A_C	12	Sim	c.1955G>T	p.Ser652Ile	0.0003183
	<i>MUC16</i>	rs184811119	1 of 5 Predicted as Damaging	19:9072561	NM_024690.2	Missense	A_G	3	Sim	c.14885C>T	p.Thr4962Ile	0.003107
	<i>NPHP4</i>	rs139022622	3 of 5 Predicted as Damaging	1:5926503	NM_015102.4	Missense	A_G	26	Sim	c.3574C>T	p.Arg1192Trp	0.002672
	<i>OR10H4</i>	rs140031931	1 of 5 Predicted as Damaging	19:16060517	NM_001004465.1	Missense	A_G	1	Não	c.700G>A	p.Glu234Lys	0.0002059
	<i>OR14J1</i>	rs143005910	3 of 5 Predicted as Damaging	6:29275029	NM_030946.1	Missense	C_G	1	Não	c.563C>G	p.Ser188Cys	0.0002494
	<i>PDE4C</i>	rs147234546	4 of 5 Predicted as Damaging	19:18330088	NM_000923	Missense	C_G	8,7,9	Sim	c.922C>G	p.Pro308Ala	0.001966

	<i>PKD1L3</i>	rs79285204	n/a	16:71986816	NM_181536.1	Missense	A_G	18	Sim	c.2986C>T	p.Leu996Phe	0.0001473
	<i>PLIN5</i>	rs200382199	0 of 5 Predicted as Damaging	19:4524997	NM_001013706.2	Missense	A_G	7	Não	c.812C>T	p.Pro271Leu	0.0008628
	<i>PMPCB</i>	rs138251541	1 of 5 Predicted as Damaging	7:102937914	NM_004279.2	Missense	C_T	1	Sim	c.8C>T	p.Ala3Val	0.002249
	<i>PPMIE</i>	rs116991234	0 of 5 Predicted as Damaging	17:56833612	NM_014906.4	Missense	C_G	1	Não	c.254C>G	p.Pro85Arg	0.01102
	<i>PPP1R16B</i>	rs61752055	1 of 5 Predicted as Damaging	20:37547022	NM_015568.2	Missense	A_C	10,11	Não	c.1417A>C	p.Lys473Gln	0.004377
	<i>PSMB11</i>	rs200339082	1 of 5 Predicted as Damaging	14:23511939	NM_001099780.1	Missense	C_T	1	Sim	c.505C>T	p.Arg169Cys	0.001534
	<i>RARS2</i>	rs143389605	4 of 5 Predicted as Damaging	6:88258318	NM_020320.3	Missense	C_T	6	Sim	c.442A>G	p.Thr148Ala	0.0006698
	<i>RECK</i>	Ausente no dbSNP	1 of 5 Predicted as Damaging	9:36108143	n/a	Missense	A_G	14	Sim	n/a	n/a	n/a
	<i>SLC30A10</i>	rs188273166	2 of 5 Predicted as Damaging	1:220101499	NM_018713.2	Missense	A_G	1	Sim	c.284C>T	p.Thr95Ile	0.0006712
	<i>SELP</i>	rs144853111	1 of 5 Predicted as Damaging	1:169564037	NM_003005.3	Missense	C_T	13	Sim	c.2180G>A	p.Gly727Glu	0.001213
	<i>SERPINB4</i>	Ausente no dbSNP	n/a	18:61306960	n/a	Frameshift	_G	6	Não	n/a	n/a	n/a
	<i>SSPO</i>	rs202034436	n/a	7:149473580	NM_198455.2	Missense	A_G	2	Não	c.196A>G	p.Thr66Ala	0.003295
	<i>SSPO</i>	rs199795943	n/a	7:149489540	NM_198455.2	Missense	A_G	37	Não	c.5693G>A	p.Arg1898Gln	0.002792
	<i>STK11IP</i>	rs149218768	3 of 5 Predicted as Damaging	2:220470710	NM_052902.3	Missense	A_G	9	Sim	c.811G>A	p.Asp260Asn	0.005275
	<i>SYNE2, MIR548AZ</i>	rs148582250	0 of 5 Predicted as Damaging	14:64593458	NM_182914.2	Missense	C_T	73	Sim	c.13850C>T	p.Thr461Ile	0.0006031
	<i>TMEM217</i>	rs150173395	1 of 5 Predicted as Damaging	6:37186394	NM_145316.3	Missense	A_G	2	Não	c.413T>C	p.Met138Thr	0.001878
	<i>TRPM2</i>	rs144380426	0 of 5 Predicted as Damaging	21:45846544	NM_003307.3	Missense	C_T	26	Sim	c.3797C>T	p.Thr1266Met	0.002094
	<i>TYW1</i>	rs151211596	0 of 5 Predicted as Damaging	7:66483114	NM_018264.3	Missense	A_G	6	Sim	c.845A>G	p.His282Arg	0.00324
	<i>UNC93A</i>	rs145360877	1 of 5 Predicted as Damaging	6:167717457	NM_018974.3	Stop códon	C_T	4,5	Sim	c.676C>T	p.Arg226Ter	0.002356
	<i>VWA3B</i>	rs144102300	1 of 5 Predicted as Damaging	2:98737884	NM_144992.4	Missense	A_G	5	Não	c.665G>A	p.Arg222His	0.003081
	<i>ZFAND2B</i>	rs140672104	2 of 5 Predicted as Damaging	2:220072753	NM_138802.2	Missense	C_T	5,4	Não	c.427C>T	p.Arg143Trp	0.0004809
	<i>ZNF311</i>	rs141472269	0 of 5 Predicted as Damaging	6:28967384	NM_001010877.2	Missense	C_T	5	Não	c.190G>A	p.Val64Met	0.0003799
	<i>ZNF337</i>	rs146305250	1 of 5 Predicted as Damaging	20:25655849	NM_015655.3	Missense	C_T	5	Não	c.2075G>A	p.Arg692Gln	0.002265
	<i>ZNF396</i>	rs137966135	0 of 5 Predicted as Damaging	18:32954082	NM_145756.2	Missense	C_T	2	Sim	c.175G>A	p.Gly59Ser	0.0002389
	<i>ZNF512</i>	rs202090122	n/a	2:27805962	NM_032434	5'UTR	A_G	1	Não	c.-18A>G	n/a	0.001417
Família 2	<i>ADAMTS4</i>	rs149404061	2 of 5 Predicted as Damaging	1:161160956	NM_005099.4	Missense	C_T	9	Sim	c.2486G>A	p.Arg829Gln	0.001055
	<i>ATAD3B</i>	rs148709813	2 of 5 Predicted as Damaging	1:1423256	NM_031921.4	Missense	A_G	12	Sim	c.1228A>G	p.Met410Val	0.0006115
	<i>BPHL</i>	rs140507260	4 of 5 Predicted as Damaging	6:3152781	NM_004332.3	Missense	A_G	7,9,8,8	Sim	c.848A>G	p.Asn283Ser	0.001986
	<i>Clorf106</i>	rs141815054	0 of 5 Predicted as Damaging	1:200870222	NM_018265.3	Missense	A_G	5	Não	c.752G>A	p.Arg251His	0.0004239
	<i>CEP250</i>	rs61729984	2 of 5 Predicted as Damaging	20:34092583	NM_007186.4	Missense	A_G	30	Sim	c.6386A>G	p.His2129Arg	0.001788
	<i>CEP290</i>	rs201988582	3 of 5 Predicted as Damaging	12:88519120	NM_025114.3	Missense	A_C	13	Sim	c.1092T>G	p.Ile364Met	0.002039
	<i>CHPT1</i>	rs141024430	2 of 5 Predicted as Damaging	12:102117558	NM_020244.2	Missense	G_T	7	Não	c.998G>T	p.Gly333Val	0.0005804
	<i>CYP4Z1</i>	rs74509104	0 of 5 Predicted as Damaging	1:47534301	NM_178134.2	Missense	C_G	2	Não	c.185C>G	p.Pro62Arg	0.00193
	<i>DHX33</i>	rs141223137	4 of 5 Predicted as Damaging	17:5364393	NM_020162.3	Missense	A_G	3,4	Não	c.715T>C	p.Phe239Leu	0.004527
	<i>DNAH1</i>	rs61734644	4 of 5 Predicted as Damaging	3:52384594	NM_015512.4	Missense	A_G	16	Sim	c.2717A>G	p.Asp906Gly	0.004655

	<i>EFHC1</i>	rs137852776	3 of 5 Predicted as Damaging	6:52317597	NM_018100.3	Missense	C_T	4,5	Sim	c.685T>C	p.Phe229Leu	0.003575
	<i>GDF2</i>	rs142402214	3 of 5 Predicted as Damaging	10:48414216	NM_016204.2	Missense	C_T	2	Sim	c.652G>T	p.Asp218Tyr	0.003181
	<i>HPS5</i>	rs143784823	0 of 5 Predicted as Damaging	11:18318354	NM_181507	Missense	C_T	11,12	Sim	c.1501G>A	p.Gly501Arg	0.004406
	<i>IGSF5</i>	rs139012406	0 of 5 Predicted as Damaging	21:41160099	NM_001080444.1	Missense	A_C	6	Sim	c.940C>A	p.Arg314Ser	0.001693
	<i>IHH</i>	rs140093604	3 of 5 Predicted as Damaging	2:219920308	NM_002181.3	Missense	A_G	3	Sim	c.857C>T	p.Pro286Leu	0.001261
	<i>IMPG1</i>	rs201003227	0 of 5 Predicted as Damaging	6:76728488	NM_001563.3	Missense	C_T	6,7	Sim	c.754G>A	p.Ala252Thr	0.0001896
	<i>ITIH6</i>	rs138859859	1 of 5 Predicted as Damaging	X:54800542	NM_198510.2	Missense	C_T	6	Não	c.875G>A	p.Ser292Asn	0.00406
	<i>KIAA1751</i>	rs78791970	1 of 5 Predicted as Damaging	1:1900211	NM_001080484	Missense	C_T	11	Não	c.1108G>A	p.Glu370Lys	0.004546
	<i>KIAA2022</i>	rs143577015	0 of 5 Predicted as Damaging	X:73960146	NM_001008537.2	Missense	A_G	3	Sim	c.4246C>T	p.Pro1416Ser	0.004207
	<i>MARVELD2</i>	rs115738510	2 of 5 Predicted as Damaging	5:68715940	NM_001038603	Missense	A_G	2	Sim	c.728A>G	p.Tyr243Cys	0.0002636
	<i>MIR548F1,TPR</i>	rs201004855	4 of 5 Predicted as Damaging	1:186313197	NM_003292.2	Missense	C_T	26	Sim	c.3443G>A	p.Arg1148His	0.004316
	<i>MTHFD2L</i>	rs61744957	1 of 5 Predicted as Damaging	4:75040404	NM_001144978.1	Missense	A_G	2	Não	c.325G>A	p.Val109Ile	0.0005775
	<i>MYO15A</i>	rs183969516	1 of 5 Predicted as Damaging	17:18022937	NM_016239.3	Missense	C_G	2	Sim	c.823G>C	p.Gly275Arg	0.001249
	<i>MYO7A</i>	rs41298135	5 of 5 Predicted as Damaging	11:76869378	NM_000260	Missense	A_G	9	Sim	c.905G>A	p.Arg302His	0.003541
	<i>NDUFV3</i>	rs77606940	0 of 5 Predicted as Damaging	21:44313454	NM_021075.3	Missense	C_G	1	Sim	c.11C>G	p.Pro4Arg	0.002601
	<i>NLRP2</i>	rs145736130	0 of 5 Predicted as Damaging	19:55505686	NM_017852.3	Missense	C_G	10,11,12	Sim	c.2758C>G	p.Leu920Val	0.0007413
	<i>PIK3R6</i>	rs146453555	n/a	17:8731929	NM_001010855	Missense	C_T	11	Sim	c.1268A>G	p.Asp423Gly	0.005184
	<i>PKHD1L1</i>	rs186716306	1 of 5 Predicted as Damaging	8:110432873	NM_177531.4	Missense	A_G	23	Sim	c.2651A>G	p.Tyr884Cys	0.00219
	<i>PPEF2</i>	rs140029551	0 of 5 Predicted as Damaging	4:76797597	NM_006239.2	Missense	C_T	11	Sim	c.1163G>A	p.Arg388Gln	0.001474
	<i>PRSS36</i>	rs191779462	1 of 5 Predicted as Damaging	16:31160532	NM_173502.4	Missense	G_T	4	Sim	c.134C>A	p.Ala45Asp	0.002513
	<i>PTPRR</i>	rs142559906	3 of 5 Predicted as Damaging	12:71286499	NM_002849.3	Missense	A_T	2	Sim	c.317T>A	p.Val106Glu	0.0009893
	<i>SEZ6L2</i>	rs184056093	2 of 5 Predicted as Damaging	16:29908385	NM_001243332	Missense	A_G	2,3	Não	c.269C>T	p.Pro90Leu	0.006533
	<i>SLC6A5</i>	rs75450512	3 of 5 Predicted as Damaging	11:20676326	NM_004211.3	Missense	A_G	16	Sim	c.2306G>A	p.Arg769His	0.0008072
	<i>SPP2</i>	rs143244045	n/a	2:234959430	NM_006944.2	5'UTR	A_C	1	Sim	c.-1C>A	n/a	0.0003384
	<i>SSB</i>	Ausente no dbSNP	n/a	2:170667795	n/a	INDEL	_' _ATGATGAAC	11	Sim	n/a	n/a	n/a
	<i>TAF13</i>	rs148869652	n/a	1:109618571	NM_005645.3	5'UTR	C_T	1	Sim	c.-2G>A	n/a	0.003941
	<i>UBXN7</i>	rs61742253	1 of 5 Predicted as Damaging	3:196098796	NM_015562.1	Missense	C_T	6	Não	c.586A>G	p.Ile196Val	0.002504
	<i>WDR66</i>	rs199850417	2 of 5 Predicted as Damaging	12:122439428	NM_144668.5	Missense	G_T	21	Não	c.3261G>T	p.Met1087Ile	0.0002815
	<i>ZMYM4</i>	rs142484548	3 of 5 Predicted as Damaging	1:35885121	NM_005095.2	Missense	A_G	30	Não	c.4490G>A	p.Arg1497His	0,00009884
Família 3	<i>ABHD15</i>	rs141385558	1 of 5 Predicted as Damaging	17:27893545	NM_198147.2	Missense	C_T	1	Não	c.440G>A	p.Gly147Asp	0.0008863
	<i>ACO1</i>	rs41313772	3 of 5 Predicted as Damaging	9:32405589	NM_002197.2	Missense	G_T	3,2	Sim	c.85G>T	p.Asp29Tyr	0.0009586
	<i>ADAM2</i>	rs201482345	2 of 5 Predicted as Damaging	8:39645714	NM_001464.4	Missense	A_C	8,9	Sim	c.699T>G	p.Asp233Glu	0.000133
	<i>ANKMY1</i>	rs149558313	3 of 5 Predicted as Damaging	2:241439525	NM_001282771	Missense	A_G	11,14,15	Não	c.2656C>T	p.Arg886Cys	0.003872
	<i>ANKS1B,FAM71C</i>	rs137864081	0 of 5 Predicted as Damaging	12:100042482	NM_153364.3	Missense	C_T	1	Sim	c.530T>C	p.Val177Ala	0.0009845

	<i>AQP6</i>	rs200570924	5 of 5 Predicted as Damaging	12:50367213	NM_001652.3	Missense	C_T	1	Sim	c.257C>T	p.Thr86Met	0.0001579
	<i>ARHGAP40</i>	rs73101927	0 of 5 Predicted as Damaging	20:37258265	NM_001164431.1	Missense	C_T	5	Não	c.752C>T	p.Thr251Ile	0.003468
	<i>AVPR1A</i>	rs143654785	1 of 5 Predicted as Damaging	12:63541203	NM_000706.4	Missense	C_G	2	Sim	c.1193C>G	p.Thr398Arg	0.0008566
	<i>CCDC168</i>	rs181067307	n/a	13:103390959	NM_001146197.1	Missense	G_T	4	Não	c.12088A>C	p.Lys403Gln	0.001518
	<i>CLCNKA</i>	rs138110172	2 of 5 Predicted as Damaging	1:16354581	NM_004070.3	Missense	C_T	9,1	Sim	c.935C>T	p.Thr312Ile	0.002431
	<i>EP400</i>	rs61742400	1 of 5 Predicted as Damaging	12:132446437	NM_015409.4	Missense	A_G	2	Sim	c.1273A>G	p.Ile425Val	0.0002149
	<i>ERI2</i>	rs200253322	1 of 5 Predicted as Damaging	16:20809303	NM_001142725.1	Missense	C_T	9	Não	c.1819G>A	p.Val607Ile	0.004106
	<i>FGD5</i>	rs188185209	1 of 5 Predicted as Damaging	3:14958805	NM_152536.3	Missense	A_G	12	Não	c.3455G>A	p.Arg1152Gln	0.0005558
	<i>FXR2</i>	rs201715714	2 of 5 Predicted as Damaging	17:7496478	NM_004860.3	Missense	A_G	13	Sim	c.1352C>T	p.Thr451Ile	0.0005206
	<i>HOXC10</i>	rs78002127	2 of 5 Predicted as Damaging	12:54379678	NM_017409.3	Missense	A_G	1	Sim	c.635A>G	p.Asn212Ser	0.0007514
	<i>HRNR</i>	rs141263661	1 of 5 Predicted as Damaging	1:152191578	NM_001009931.2	Stop códon	A_G	3	Não	c.2527C>T	p.Arg843Ter	0.0002224
	<i>IQUB</i>	rs146361404	0 of 5 Predicted as Damaging	7:123143161	NM_178827.4	Missense	C_T	5	Não	c.704A>G	p.Gln235Arg	0.001662
	<i>IQUB</i>	rs138085330	1 of 5 Predicted as Damaging	7:123143364	NM_178827.4	Missense	C_T	4	Não	c.586G>A	p.Glu196Lys	0.001837
	<i>KANSL1L</i>	rs148825055	3 of 5 Predicted as Damaging	2:211018702	NM_152519.3	Missense	A_G	2	Não	c.605C>T	p.Pro202Leu	0.002868
	<i>LBP</i>	rs45534540	1 of 5 Predicted as Damaging	20:36979245	NM_004139.4	Missense	A_T	3	Sim	c.271T>A	p.Ser91Thr	0.001133
	<i>LRP1B</i>	rs79879036	3 of 5 Predicted as Damaging	2:141092084	NM_018557.2	Missense	G_T	79	Sim	c.12161A>C	p.Glu4054Ala	0.003463
	<i>LRP1B</i>	rs151247276	1 of 5 Predicted as Damaging	2:142012161	NM_018557.2	Missense	C_T	4	Sim	c.393G>A	p.Met131Ile	0.001111
	<i>MASP1</i>	rs116001173	1 of 5 Predicted as Damaging	3:186970985	NM_139125	Missense	C_T	5,6	Sim	c.863G>A	p.Arg288Gln	0.0004118
	<i>MCM3</i>	rs148636199	4 of 5 Predicted as Damaging	6:52138606	NM_002388	Missense	A_G	9,10	Sim	c.1618C>T	p.Arg540Trp	0.00007424
	<i>MLPH</i>	rs140017366	0 of 5 Predicted as Damaging	2:238434379	NM_024101	Missense	A_G	6,7	Sim	c.811G>A	p.Gly271Ser	0.0008059
	<i>MRPL52</i>	rs146757783	0 of 5 Predicted as Damaging	14:23299146	NM_178336	Missense	C_T	1	Sim	c.25T>C	p.Phe9Leu	0.004627
	<i>NID2</i>	rs35147930	4 of 5 Predicted as Damaging	14:52505546	NM_007361	Missense	C_T	9	Sim	c.2176G>A	p.Val726Met	0.004301
	<i>NUP153</i>	rs61748574	0 of 5 Predicted as Damaging	6:17637979	NM_001278209	Missense	A_C	17,15,16	Sim	c.1962T>G	p.Asp654Glu	0.004825
	<i>PDE1C</i>	rs78124500	n/a	7:32110008	NM_001191058	Splice acceptor	C_T	1	Sim	c.308+99389G>A	n/a	0.001295
	<i>PHTF2</i>	rs201083715	0 of 5 Predicted as Damaging	7:77539659	NM_001127357	Missense	A_G	6,7	Não	c.607A>G	p.Thr203Ala	0.00222
	<i>POR</i>	rs145782750	1 of 5 Predicted as Damaging	7:75615552	NM_000941	Missense	A_G	15	Sim	c.1891G>A	p.Val631Ile	0.00174
	<i>PPL</i>	rs138302153	0 of 5 Predicted as Damaging	16:4940732	NM_002705	Missense	C_T	17	Sim	c.2159G>A	p.Arg720His	0.004316
	<i>PRDM1</i>	rs139534654	3 of 5 Predicted as Damaging	6:106543549	NM_001198	Missense	A_G	3	Sim	c.351A>G	p.Ile117Met	0.0007584
	<i>PTH2R</i>	rs144641723	0 of 5 Predicted as Damaging	2:209308236	NM_005048	Missense	G_T	6	Sim	c.673G>T	p.Ala225Ser	0.002758
	<i>RGL1, APOBE C4</i>	rs147640407	0 of 5 Predicted as Damaging	1:183617288	NM_015149	Missense	A_G	2	Sim	c.-33+11652A>G	p.Val210Ala	0.001195
	<i>RUFY4</i>	rs189254591	0 of 5 Predicted as Damaging	2:218937209	NM_198483	Missense	A_G	7,5	Não	c.266G>A	p.Arg89His	0.003266
	<i>SEMA6A</i>	rs199819147	1 of 5 Predicted as Damaging	5:115782795	NM_020796	Missense	G_T	19	Sim	c.2607C>A	p.Asn869Lys	0.002296
	<i>SFT2D2</i>	rs148619520	1 of 5 Predicted as Damaging	1:168195335	NM_199344	Missense	C_G	1	Não	c.18G>C	p.Lys6Asn	0.0004557
	<i>SLC25A47</i>	rs145556108	3 of 5 Predicted as Damaging	14:100795869	NM_207117	Missense	C_T	6	Sim	c.814C>T	p.Arg272Trp	0.0004226

	<i>SLC30A8</i>	rs148043363	2 of 5 Predicted as Damaging	8:118159254	NM_173851	Start códon prematuro	A_C	4,5,3,2	Sim	c.133C>A	p.Leu45Met	0.0002637
	<i>SULT6B1</i>	rs75398209	2 of 5 Predicted as Damaging	2:37406643	NM_001032377	Missense	C_T	4	Não	c.373G>A	p.Gly125Ser	0.003534
	<i>SYDE2</i>	rs41289745	0 of 5 Predicted as Damaging	1:85647905	NM_032184	Missense	A_G	3	Não	c.2420T>C	p.Ile807Thr	0.002514
	<i>TBC1D32</i>	rs191814118	4 of 5 Predicted as Damaging	6:121562641	NM_152730	Missense	C_T	19	Não	c.2215G>A	p.Ala739Thr	0.002462
	<i>TCEAL2</i>	rs142560569	2 of 5 Predicted as Damaging	X:101382176	NM_080390	Missense	C_T	3	Não	c.374C>T	p.Ala125Val	0.0001611
	<i>TDRD6</i>	rs201779806	1 of 5 Predicted as Damaging	6:46655876	NM_001010870	Missense	C_T	1	Sim	c.11C>T	p.Thr4Met	0.005138
	<i>TEAD4</i>	rs149743004	1 of 5 Predicted as Damaging	12:3126691	NM_003213	Missense	A_G	6,4	Sim	c.482G>A	p.Gly161Glu	0.001962
	<i>TMEM251</i>	rs189524704	1 of 5 Predicted as Damaging	14:93652787	NM_001098621	Missense	C_T	2	Não	c.281C>T	p.Thr94Ile	0.001292
	<i>TRAP1</i>	rs61758086	4 of 5 Predicted as Damaging	16:3736085	NM_016292	Missense	C_T	3,4	Sim	c.383G>A	p.Arg128His	0.003344
	<i>TYMP</i>	rs143789597	1 of 5 Predicted as Damaging	22:50967740	NM_001257989	Missense	C_T	2,3	Sim	c.242G>A	p.Arg81Gln	0.001127
	<i>USPL1</i>	rs141608033	0 of 5 Predicted as Damaging	13:31205536	NM_005800	Missense	A_C	4	Não	c.793A>C	p.Ile265Leu	0.0003955
	<i>UTP20</i>	rs142220773	1 of 5 Predicted as Damaging	12:101680273	NM_014503	Missense	A_G	5	Sim	c.501G>A	p.Met167Ile	0.001693
	<i>VNN2</i>	rs142626186	5 of 5 Predicted as Damaging	6:133076999	NM_004665	Missense	C_T	3,4	Sim	c.520G>A	p.Val174Met	0.00311
	<i>WDR52</i>	rs185086524	3 of 5 Predicted as Damaging	3:113022889	NM_001164496	Missense	A_G	32	Não	c.4951C>T	p.Arg1651Trp	0.001612
	<i>WRN</i>	rs4987238	1 of 5 Predicted as Damaging	8:30938692	NM_000553	Missense	G_T	9	Sim	c.1149G>T	p.Leu383Phe	0.001924
	<i>WRN</i>	rs140768346	0 of 5 Predicted as Damaging	8:30998961	NM_000553	Missense	A_G	25	Sim	c.2983G>A	p.Ala995Thr	0.002211
	<i>ZFAT</i>	rs75596750	3 of 5 Predicted as Damaging	8:135622851	NM_020863	Missense	A_G	4,5	Sim	c.496C>T	p.Arg166Trp	0.0004803
	<i>ZFHX3</i>	rs149908041	1 of 5 Predicted as Damaging	16:72821110	NM_006885	Missense	C_T	10,9	Sim	c.11065A>G	p.Lys3689Glu	0.0009127
	<i>ZNF430</i>	rs139084188	3 of 5 Predicted as Damaging	19:21239487	NM_025189	Missense	G_T	5	Não	c.373G>T	p.Asp125Tyr	0.003792
	<i>ZNF679</i>	rs78910755	0 of 5 Predicted as Damaging	7:63726304	NM_153363	Missense	C_T	5	Não	c.293C>T	p.Pro98Leu	0.003016
Familia 4	<i>ACSM5</i>	rs138834094	2 of 5 Predicted as Damaging	16:20442594	NM_017888	Missense	C_T	10	Não	c.1259C>T	p.Ala420Val	0.004036
	<i>ANO9</i>	rs150163423	1 of 5 Predicted as Damaging	11:433417	NM_001012302	Missense	C_T	4	Não	c.247G>A	p.Asp83Asn	0.0007544
	<i>BRINP1</i>	Ausente no dbSNP	2 of 5 Predicted as Damaging	9:121930413	n/a	Missense	C_T	8	Sim	n/a	n/a	n/a
	<i>C15orf27</i>	rs149378942	4 of 5 Predicted as Damaging	15:76452476	NM_152335	Missense	C_G	5	Não	c.423C>G	p.Ile141Met	0.002277
	<i>C1orf145, OBS CN</i>	rs191837710	4 of 5 Predicted as Damaging	1:228399519	NM_001271223	Missense	A_T	2	Sim	c.35T>A	p.Phe12Tyr	0.004921
	<i>C8orf74</i>	rs186803488	4 of 5 Predicted as Damaging	8:10532237	NM_001040032	Missense	A_C	2	Não	c.130C>A	p.Leu44Met	0.001334
	<i>CACNA1S</i>	rs149547196	0 of 5 Predicted as Damaging	1:201009066	NM_000069	Missense	A_G	44	Sim	c.5515C>T	p.Pro1839Ser	0.002299
	<i>CBX2</i>	rs149210919	2 of 5 Predicted as Damaging	17:77758091	NM_005189	Missense	G_T	5	Sim	c.849G>T	p.Lys283Asn	0.00325
	<i>CLK2</i>	rs12749700	0 of 5 Predicted as Damaging	1:155240714	NM_003993	Missense	G_T	2	Sim	c.55C>A	p.Arg19Ser	0.001673
	<i>COMP</i>	rs186562511	n/a	19:18902087	NM_000095	5'UTR	A_C	1	Sim	c.-9G>T	n/a	0.001283
	<i>CORO7-PAM16, CORO7, VASN</i>	rs148092711	4 of 5 Predicted as Damaging	16:4431767	NM_138440	Missense	C_T	2	Sim	c.889C>T	p.Arg297Cys	0.003202
	<i>CSMD2</i>	rs147528807	1 of 5 Predicted as Damaging	1:34090765	NM_001281956	Missense	C_T	34	Sim	c.5386A>G	p.Ile1796Val	0.0008687
	<i>DAAM2</i>	rs183543237	3 of 5 Predicted as Damaging	6:39846016	NM_001201427	Missense	C_G	12	Sim	c.1339C>G	p.Gln447Glu	0.001476

	<i>DDX60L</i>	rs189472897	1 of 5 Predicted as Damaging	4:169341450	NM_001012967	Missense	A_C	18	Não	c.2476T>G	p.Phe826Val	0.0007575
	<i>DENND1C</i>	rs202155397	0 of 5 Predicted as Damaging	19:6467966	NM_024898	Missense	A_G	23	Não	c.1955C>T	p.Thr652Met	0.0008594
	<i>EZH1</i>	rs146736585	4 of 5 Predicted as Damaging	17:40879667	NM_001991	Missense	G_T	4	Sim	c.232C>A	p.Pro78Thr	0.001228
	<i>FAM73B</i>	rs150751770	1 of 5 Predicted as Damaging	9:131811693	NM_032809	Missense	G_T	5	Não	c.454G>T	p.Ala152Ser	0.003352
	<i>FCER2</i>	rs138917660	0 of 5 Predicted as Damaging	19:7763669	NM_002002	Missense	C_T	2,3	Sim	c.94G>A	p.Ala32Thr	0.004666
	<i>GNAI4</i>	rs61755085	3 of 5 Predicted as Damaging	9:80040495	NM_004297	Missense	C_T	6	Sim	c.860A>G	p.Tyr287Cys	0.001506
	<i>HAPLN3</i>	rs149540064	2 of 5 Predicted as Damaging	15:89424612	NM_178232	Missense	C_T	3	Não	c.469G>A	p.Gly157Ser	0.0009626
	<i>HELZ2</i>	rs116816080	4 of 5 Predicted as Damaging	20:62198961	NM_001037335	Missense	A_G	1,7	Sim	c.1750C>T	p.Arg584Trp	0.004035
	<i>HYDIN</i>	rs140875580	0 of 5 Predicted as Damaging	16:71098642	NM_001270974	Missense	C_T	16	Sim	c.2177A>G	p.Asp726Gly	0.002748
	<i>ID3</i>	rs146163818	3 of 5 Predicted as Damaging	1:23885773	NM_002167	Missense	A_T	1	Sim	c.145T>A	p.Ser49Thr	0.00009192
	<i>KPNA7</i>	rs116916633	4 of 5 Predicted as Damaging	7:98786092	NM_001145715	Missense	A_G	6	Não	c.731C>T	p.Pro244Leu	0.004505
	<i>KRT77</i>	rs150981240	4 of 5 Predicted as Damaging	12:53086341	NM_175078	Missense	G_T	7	Sim	c.1291C>A	p.Leu431Met	0.00508
	<i>MDN1</i>	rs62417304	0 of 5 Predicted as Damaging	6:90422360	NM_014611	Missense	C_T	48	Não	c.7364G>A	p.Arg2455Gln	0.002291
	<i>MPEG1</i>	rs143527301	4 of 5 Predicted as Damaging	11:58980122	NM_001039396	Missense	C_T	1	Sim	c.217A>G	p.Thr73Ala	0.002343
	<i>MYH6</i>	rs143978652	3 of 5 Predicted as Damaging	14:23862646	NM_002471	Missense	A_C	23	Sim	c.3010G>T	p.Ala1004Ser	0.0009801
	<i>OR51B5,OR51M1</i>	rs182074434	1 of 5 Predicted as Damaging	11:5410769	NM_001004756	Stop códon	C_G	1	Não	c.141C>G	p.Tyr47Ter	0.001582
	<i>PEX7</i>	rs113268723	3 of 5 Predicted as Damaging	6:137166790	NM_000288	Missense	A_C	4	Sim	c.377A>C	p.Gln126Pro	0.003798
	<i>PLA2G7</i>	rs145315433	0 of 5 Predicted as Damaging	6:46684792	NM_005084	Missense	A_T	3	Sim	c.151T>A	p.Phe51Ile	0.002051
	<i>RCOR3</i>	rs149116704	2 of 5 Predicted as Damaging	1:211451474	NM_001136223	Missense	A_G	5,6	Não	c.532A>G	p.Ile178Val	0.0005646
	<i>SLC11A2</i>	rs144863268	2 of 5 Predicted as Damaging	12:51386017	NM_001174125	Missense	G_T	12,13	Sim	c.1390C>A	p.Leu464Ile	0.002521
	<i>SLC12A7</i>	rs151053159	2 of 5 Predicted as Damaging	5:1078832	NM_006598	Missense	C_T	11	Sim	c.1438G>A	p.Val480Met	0.001503
	<i>SLC5A11</i>	rs147549055	1 of 5 Predicted as Damaging	16:24873990	NM_052944	Stop códon	A_G	3,4	Sim	c.204G>A	p.Trp68Ter	0.0007087
	<i>SLIT2</i>	rs143417693	0 of 5 Predicted as Damaging	4:20619178	NM_004787	Missense	C_T	35,36	Sim	c.4253C>T	p.Ala1418Val	0.003509
	<i>SYNM</i>	rs187807624	3 of 5 Predicted as Damaging	15:99671591	NM_145728	Missense	C_T	4	Sim	c.3025T>C	p.Val1008Ala	0.0002795
	<i>TENM4</i>	rs201179027	3 of 5 Predicted as Damaging	11:78383209	NM_001098816	Missense	A_T	31	Sim	c.5662T>A	p.Ser1888Thr	0.0003234
	<i>TMEM114</i>	rs141472774	3 of 5 Predicted as Damaging	16:8620007	NM_001146336	Splice acceptor	A_G	2	Sim	c.139C>T	p.Ala47Val	0.007441
Família 5	<i>ABO</i>	rs56116432	n/a	9:136131429	NM_020469	Missense	C_T	7	Sim	c.688G>A	n/a	0.004439
	<i>CENPO</i>	rs146239018	0 of 5 Predicted as Damaging	2:25039615	NM_024322	Missense	C_T	5,6	Sim	c.695C>T	p.Pro232Leu	0.001584
	<i>CNTROB</i>	rs149069306	0 of 5 Predicted as Damaging	17:7840531	NM_001037144	Missense	A_G	7	Sim	c.878A>G	p.Asn293Ser	0.0001895
	<i>CTBP2</i>	rs185994757	4 of 5 Predicted as Damaging	10:126715118	NM_022802	Missense	C_T	1	Sim	c.1211G>A	p.Arg404His	0.003327
	<i>DAB2</i>	rs61755342	0 of 5 Predicted as Damaging	5:39377259	NM_001343	Missense	C_T	11,12	Sim	c.1630G>A	p.Val544Ile	0.003621
	<i>DBN1</i>	rs151027179	0 of 5 Predicted as Damaging	5:176885421	NM_080881	Missense	C_T	12,13	Sim	c.1420G>A	p.Ala474Thr	0.0002806
	<i>FAM83E</i>	rs144922959	1 of 5 Predicted as Damaging	19:49116200	NM_017708	Missense	C_G	1	Não	c.430G>C	p.Glu144Gln	0.01512
	<i>FMNL2</i>	Ausente no dbSNP	n/a	2:153493057	n/a	Deleção inframe	-_AAT	22	Não	n/a	n/a	n/a

	<i>FOXK2</i>	rs146173102	3 of 5 Predicted as Damaging	17:80544980	NM_004514	Missense	A_G	8	Sim	c.1618G>A	p.Gly540Ser	0.001207
	<i>HMCN1,MIR548F1</i>	rs41317483	3 of 5 Predicted as Damaging	1:186072727	NM_031935	Missense	A_G	69	Sim	c.10697G>A	p.Gly3566Asp	0.002326
	<i>IL17RC</i>	rs143412184	3 of 5 Predicted as Damaging	3:9959753	NM_153461	Missense	A_G	3	Sim	c.487G>A	p.Val163Met	0.003286
	<i>KRT82</i>	rs139209735	4 of 5 Predicted as Damaging	12:52790747	NM_033033	Missense	A_G	6	Sim	c.988C>T	p.Arg330Cys	0.0009561
	<i>LCN2</i>	rs147787222	2 of 5 Predicted as Damaging	9:130911830	NM_005564	Missense	G_T	1	Sim	c.26G>T	p.Gly9Val	0.001372
	<i>OTOGL</i>	rs143495342	1 of 5 Predicted as Damaging	12:80771734	NM_173591	Missense	A_G	58	Não	c.6941G>A	p.Arg2314Gln	0.002025
	<i>PIP5K1B</i>	rs138209413	1 of 5 Predicted as Damaging	9:71606067	NM_003558	Missense	C_T	15	Sim	c.1514C>T	p.Pro505Leu	0.0008402
	<i>SBF2</i>	rs141330687	2 of 5 Predicted as Damaging	11:9878045	NM_030962	Missense	C_T	19	Sim	c.2323G>A	p.Gly775Ser	0.003221
	<i>SERPINA11</i>	rs61738925	4 of 5 Predicted as Damaging	14:94914667	NM_001080451	Missense	A_G	2	Não	c.445C>T	p.Pro149Ser	0.002232
	<i>TCF15</i>	rs141645685	5 of 5 Predicted as Damaging	20:585267	NM_004609	Missense	C_T	2	Sim	c.568G>A	p.Gly190Arg	0.001445
	<i>TDP2</i>	rs35744230	1 of 5 Predicted as Damaging	6:24666830	NM_016614	Missense	C_T	2	Sim	c.175A>G	p.Asn59Asp	0.002662
	<i>TMEM104</i>	rs150038829	1 of 5 Predicted as Damaging	17:72791739	NM_017728	Missense	C_G	8	Não	c.604C>G	p.Leu202Val	0.005012
	<i>UPP1</i>	rs116578494	4 of 5 Predicted as Damaging	7:48146994	NM_003364	Missense	C_T	5,6,8,9	Sim	c.683C>T	p.Thr228Met	0.001902
	<i>ZNF493</i>	rs139629271	1 of 5 Predicted as Damaging	19:21588637	NM_001076678	Missense	A_G	3	Não	c.232A>G	p.Ser78Gly	0.0005615
	<i>ZUFSP</i>	rs145019610	1 of 5 Predicted as Damaging	6:116968684	NM_145062	Missense	C_T	8	Não	c.1406A>G	p.Glu469Gly	0.001032