

**ALTERAÇÃO DA VIA DA RECOMBINAÇÃO
HOMÓLOGA DE REPARO DE DNA NO CÂNCER
EPITELIAL DE OVÁRIO**

ALEXANDRE ANDRÉ BALIEIRO ANASTÁCIO DA COSTA

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

Área de Concentração: Oncologia

**Orientadora: Dra Maria Isabel Alves de Souza
Waddington Achatz**

Co Orientadora: Prof. Dra Silvia Regina Rogatto

São Paulo

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

da Costa, Alexandre André Balieiro Anastácio

Alteração da via da recombinação homóloga de reparo de DNA no câncer epitelial de ovário /Alexandre André Balieiro Anastácio da Costa - São Paulo, 2016.

135p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientadora: Maria Isabel Alves de Souza Waddington Achatz

Descritores: 1. NEOPLASIAS OVARIANAS. 2. SÍNDROME HEREDITÁRIA DE CÂNCER DE MAMA E OVÁRIO. 3. Genes BRCA1. 4. Genes BRCA2. 5. REPARO DE DNA POR RECOMBINAÇÃO.

DEDICATÓRIA

Ao meu pai

“As coisas estão no mundo só que eu preciso aprender”

Paulinho da Viola

“A coisa mais bonita do mundo é aprender”

Julian Carron

AGRADECIMENTOS

Aos nossos pacientes, que generosamente assinam o termo de consentimento para utilizarmos os seus dados em pesquisa, antes ainda de conhecerem o duro caminho que alguns têm pela frente.

À minha orientadora Dra Maria Isabel, por me abrir os horizontes e oportunidades e me guiar no mundo da pesquisa e da oncogenética com brilho nos olhos e firmeza nas mãos.

À minha coorientadora, Dra Sílvia Rogatto por dar sempre o melhor e exigir o mesmo de mim

Ao meu orientador do mestrado, Dr Vladimir, com quem aprendi a curiosidade e a paixão pela pesquisa.

Aos meus professores, a quem agradeço na figura do meu professor de física do segundo grau Professor Orlandino, que moldou a forma do meu raciocínio lógico para que pudesse caminhar sozinho

Ao departamento de patologia pela colaboração neste trabalho, em especial Dra Louise de Brot, aos alunos Felipe Ilelis, Nayra Soares e Mariana Rezende. Mas também aos caros Severino e Carlos.

Aos amigos e colaboradores do laboratório e departamento de oncogenética Karina, Fernanda, Renata, Nirvana, Danielle, Ana Milena e Diogo.

Às amigas e colaboradores do laboratório Neogene Luisa, Pirsčila, Helen e Mariana.

Aos meus amigos e colegas da oncologia clínica que se dispuseram a me ajudar a flexibilizar os horários para que eu pudesse cumprir todas as obrigações do doutorado.

Aos professores dos cursos da pós graduação, em especial Dr Fábio da cirurgia pélvica pela didática e incentivo.

Aos funcionários administrativos da oncologia clínica, pela compreensão com o cansaço que algumas vezes apareceu durante o caminho.

Aos funcionários da pós graduação.

Aos funcionários da biblioteca

Aos meus pais, meus irmãos e todos os meus familiares e amigos que dividem a vida inteira comigo, por terem dividido comigo também essa parte interessante do caminho.

Muito obrigado.

RESUMO

da Costa AABA. **Alteração da via da recombinação homóloga de reparo de DNA no câncer epitelial de ovário.** São Paulo; 2016. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Justificativa: Os carcinomas de ovário apresentam deficiência da via da recombinação homóloga de reparo de DNA em aproximadamente 50% dos casos, em 15 a 20% dos casos atribuída a mutações germinativas em *BRCA1* ou *BRCA2*. Tumores com mutações germinativas em *BRCA1* ou *BRCA2* são mais sensíveis aos tratamentos com inibidores de PARP e com esquemas quimioterápicos baseados em platina. O papel de outras alterações da via da recombinação homóloga na sensibilidade a essas modalidades de tratamento bem como a forma de identificar os tumores com deficiência dessa via ainda não estão definidos. Estudos avaliando o perfil de alterações estruturais genômicas causadas especificamente por deficiência da via da recombinação homóloga têm sido estudados como potenciais marcadores da deficiência desta via. Nosso objetivo foi caracterizar uma coorte de pacientes com carcinoma de ovário quanto à deficiência da via da recombinação homóloga utilizando escores calculados a partir das alterações do número de cópias genômicas e de perdas de heterozigose e avaliar o papel destes escores na identificação de pacientes com sensibilidade prolongada à platina. **Métodos:** Selecionamos uma coorte de 31 pacientes com carcinoma de ovário com recidiva classificada clinicamente com platina resistente e que foram reexpostas ao tratamento com quimioterapia baseada em platina. Amostras de tumores armazenados em parafina de 14 pacientes foram submetidas ao ensaio ONCOSCAN para avaliação de alterações de números de cópias, perda de heterozigose e identificação de mutações específicas em 9 genes relacionados a neoplasias. A partir destes dados caracterizamos os escores de *Telomeric Allelic Imbalance* (TAI), escore de perda de heterozigose (cnLOH+L) escore de *Large Scale Transition* (LST) e escore de deficiência da recombinação homóloga (HRD) em cada tumor e avaliamos a sua associação com a taxa de resposta à quimioterapia, sobrevida global e fatores clínico patológicos.

Resultados: Na coorte de 31 pacientes, DNA foi extraído de 28 amostras e 15 amostras de 14 pacientes foram analisadas de forma efetiva. Na maioria dos casos encontramos o padrão esperado de grande instabilidade genômica com diversas regiões de ganhos e perdas do genoma e regiões de perda de heterozigose. Todos os casos analisados mostraram cnLOH ou delLOH no cromossomo 17, 12 de 14 pacientes apresentaram cnLOH ou delLOH no braço longo do cromossomo 13 e o cromossomo 22 apresentou perdas ou ganhos na maioria dos casos. Mutação em *TP53* foi encontrada em 2 casos, mutação em *NRAS* em 2 casos, e um caso com mutação em *TP53* apresentou mutação em *PTEN* associada a deleção da região do *PTEN*. A mediana dos escores foi de 19,5 para TAI, 12,5 para cnLOH+L, 26,0 para LST e 6,3 para HRD. Levando-se em conta os escores com pontos de corte previamente definidos na literatura encontramos 10 de 14 (escore cnLOH+L) e 9 de 14 (escore LST) pacientes com tumores com escores altos sugerindo deficiência da via da recombinação homóloga. Tanto a coorte como um todo quanto as 14 pacientes submetidas à análise molecular apresentaram taxa de resposta acima do esperado sendo 16 de 31 pacientes (51,6%) e 7 de 14 pacientes (50,0) respectivamente. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as taxas de resposta das pacientes de com escores altos versus baixos, embora 6 de 10 pacientes com escore cnLOH+L elevado tenham apresentado resposta e 1 de 4 pacientes com escore cnLOH+L baixo tenham apresentado resposta e 6 de 9 pacientes com escore LST elevado tenham apresentado resposta e 1 de 5 pacientes com escore LST baixo tenham apresentado resposta. Numericamente os escores cnLOH+L, LST e HDR foram mais altos nas pacientes que responderam quando comparados com os escores das pacientes que não responderam, com medianas de TAI = 19,0 vs 24,0, TAI_m = 16,0 vs 19,0, cnLOH+L 13 vs 12, LST = 28,0 vs 18,0, LST_m = -4,0 vs -20,0, HRD 8,7 vs 0,3 para respondedoras versus não respondedoras. Essa diferença não foi estatisticamente significativa. A sobrevida global mediana foi 13,4 meses desde o início do tratamento de reexposição à platina e não houve diferença de acordo com os valores dos escores. Dentre os fatores clinicopatológicos a presença de história familiar de câncer de mama ou ovário ou a história pessoal de câncer de mama foi o único fator associado a uma maior taxa de resposta. Os tumores primários apresentaram escore TAI mais elevado que os tumores coletados no momento da recidiva e comparando

duas amostras de uma mesma paciente houve diferença na classificação da deficiência da via da recombinação homóloga de acordo com os escores cnLOH+L e LST. **Conclusões:** Os escores de deficiência da via da recombinação homóloga se mostraram potenciais marcadores de resposta à reexposição à platina no cenário de doença platina resistente, necessitando melhor definição dos pontos de corte e do impacto da heterogeneidade tumoral e da necessidade de avaliação do material coletado no momento da recidiva. História familiar positiva é um fator clínico capaz de identificar pacientes com mais chance de resposta á reexposição á platina. Nossos dados fortalecem a hipótese da contribuição de mutações em *PTEN* para o desenvolvimento de deficiência da via da recombinação homóloga e o papel das mutações de *NRAS* nos carcinomas serosos de ovário.

SUMMARY

da Costa AABA. [**Homologous recombination deficiency in ovarian carcinoma**]. São Paulo; 2016. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Background: Homologous recombination deficiency is present in up to 50% of ovarian carcinomas, in 15 to 20% due to germline *BRCA1* or *BRCA2* mutations. *BRCA* mutated tumors are more sensitive to PARP inhibitors and platinum based chemotherapy. The role of other homologous recombination mechanisms on PARP inhibitors and platinum sensitivity as well as the methods to identify homologous recombination deficiency is not clear yet. Scores evaluating structural genomic abnormalities caused specifically by homologous recombination deficiency have been studied as markers of deficiency of this DNA repair pathway. The main objective of the present study was to characterize a cohort of ovarian cancer patients regarding homologous recombination deficiency using scores based on copy number alterations and loss of heterozygosity and to evaluate the impact of these scores in prolonged platinum sensitivity. **Methods:** We selected a cohort of 31 ovarian cancer patients with platinum resistant recurrence reexposed to platinum based chemotherapy. Paraffin embedded tumor samples from 14 patients were analyzed through ONCOSCAN assay for copy number alterations, loss of heterozygosity and specific point mutations in 9 cancer related genes. Based on these alterations we calculated the scores Telomeric Allelic Imbalance (TAI), loss of heterozygosity score (cnLOH+L) Large Scale Transition score (LST) and homologous recombination deficiency score (HRD) for each tumor sample and tested their association to response rate to platinum rechallenge, overall survival and to the clinical pathologic factors. **Results:** From the cohort of 31 patients, DNA was extracted from 28 samples and 15 samples from 14 patients were effectively analyzed. Most cases presented the expected high genomic instability pattern with lots of genomic losses, genomic gains and loss of heterozygosity segments. All cases showed cnLOH or delLOH in chromosome 17, 12 of 14 patients showed cnLOH or delLOH in the long arm of chromosome 13, and chromosome 22 presented losses or gains in most of

cases. *TP53* mutations were present in 2 cases, *NRAS* mutations in 2 cases, and one patient with *TP53* mutation showed also a *PTEN* mutation together with a genomic loss in *PTEN* region. Median scores were 19,5 for TAI, 12,5 for cnLOH+L, 26,0 for LST and 6,3 for HRD. Considering previously literature defined cutoffs we found 10 out of 14 (for cnLOH+L score) and 9 out of 14 (for LST score) patients with tumors with high scores suggesting homologous recombination deficiency. In the cohort of 31 patients 16 had response to platinum reexposition and in the cohort of 14 patients analyzed by ONCOSCAN assay 7 patients had response. There was no statistically significant difference between response rates for high versus low scores, even though 6 out of 10 patient with high cnLOH+L score while 1 out of 4 patients with low cnLOH+L score had response and 6 out of 9 patient with high cnLOH+L score while 1 out of 5 patients with low cnLOH+L score had response. Numerically, the scores cnLOH+L, LST and HDR were higher in patients with response to treatment compared to those without a response, with medians of TAI = 19,0 vs 24,0, TAI_m = 16,0 vs 19,0, cnLOH+L 13 vs 12, LST = 28,0 vs 18,0, LST_m = -4,0 vs -20,0, HRD 8,7 vs 0,3 for responders versus non responders respectively. These differences were not statistically significant. Median overall survival was 13,4 months from the beginning of platinum rechallenge and there was no difference in survival according to scores. Among clinical pathologic factors, family history of breast or ovarian cancer or personal history of breast cancer was associated to a higher response rate to platinum rechallenge. Primary tumors had a higher TAI score compared to recurrent tumors and comparing two different samples from the same patient there was divergence on the homologous recombination deficiency classification according to cnLOH+L and LST scores. **Conclusions:** Homologous recombination deficiency scores showed to be potential markers of response to platinum rechallenge in the platinum resistant setting. It is still necessary to clarify the best cutoffs for each score, the impact of tumor heterogeneity and the need of tumor samples to be collected in the moment of treatment. Positive family history is a clinical factor predictive of platinum rechallenge response. Our data support the hypothesis of a role for *PTEN* in homologous recombination deficiency as well as a role of *NRAS* mutations in ovarian serous carcinomas.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema da via da recombinação homóloga.....	25
Figura 2	Representação esquemática do método “Molecular Inversion Probe”	46
Figura 3	Padrões de frequência de alelo B (%B) e de diferença entre os alelos (A-B).....	47
Figura 4	Ilustração de alterações consideradas no escore.....	49
Figura 5	Ilustração de alterações consideradas no escore.....	50
Figura 6	Ilustração de região considerada como LST.....	51
Figura 7	Diagrama demonstrando a inclusão.....	54
Figura 8	Perfil de alterações genômicas detectados em 15 amostras de 14 pacientes com câncer de ovário.....	61
Figura 9	Alteração de número de cópias de todos os cromossomos em todas as amostras estudadas.....	62
Figura 10	Representação esquemática dos cromossomos 17 e 22.....	63
Figura 11	Comparação das alterações estruturais no genoma de duas amostras de tumor do caso 28.....	65
Figura 12	Comparação das alterações estruturais no genoma das amostras de tumores primários sem tratamento prévio e dos tumores coletados no momento da recidiva após tratamento quimioterápico.....	66

Figura 13	Correlação entre os escores.....	75
Figura 14	Taxa de resposta após tratamento com reexposição à platina de acordo com classificação por escore de deficiência de recombinação homóloga.....	78
Figura 15	Distribuição dos valores dos escores de deficiência da via da recombinação homóloga de acordo com a resposta ao tratamento de reexposição à platina.....	80
Figura 16	Sobrevida global.....	81
Figura 17	Sobrevida global na reexposição à platina de acordo com escores.....	82
Figura 18	Distribuição dos escores de deficiência de recombinação homóloga de acordo com a idade.....	83
Figura 19	Distribuição dos escores de deficiência de recombinação homóloga de acordo com o intervalo livre de platina maior que 12 meses.....	84
Figura 20	Taxa de resposta após tratamento com reexposição à platina de acordo com história familiar.....	86
Figura 21	Distribuição dos escores de deficiência de recombinação homóloga de acordo com o intervalo livre de platina maior que 12 meses.....	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Síntese das principais mutações germinativas relacionadas ao câncer de ovário.....	8
Tabela 2	Síntese das principais mutações germinativas relacionadas ao câncer de ovário.....	22
Tabela 3	Características clínicas das 31 pacientes com carcinoma de ovário selecionadas para este estudo.....	56
Tabela 4	Características clínicas individuais das 31 pacientes com carcinomas de ovário incluídas neste estudo.....	57
Tabela 5	História familiar detalhada das pacientes com história familiar positiva para câncer de mama ou ovário ou história pessoal de câncer de mama.....	59
Tabela 6	Mutações detectadas em cinco das 15 amostras testadas de 14 pacientes com câncer de ovário.....	67
Tabela 7	Contagem de regiões subtelo méricas com desbalanço de alelos por cromossomo para cálculo do escore <i>Telomeric Allelic Imbalance (TAI)</i>	68
Tabela 8	Contagem de regiões subtelo méricas com desbalanço de alelos por cromossomo para cálculo do escore <i>Telomeric Allelic Imbalance (TAI)</i> modificado.....	69
Tabela 9	Contagem de regiões de perda de heterozigose (LOH) > 15 MBp e menores que 1 cromossomo para cálculo do escore de perda de heterozigose cnLOH+L.....	70

Tabela 10	Contagem de pontos de quebra cromossômica entre regiões de larga escala para cálculo do escore de <i>Large Scale transition (LST)</i>	71
Tabela 11	Valor dos escores de deficiência de recombinação homóloga por paciente.....	73
Tabela 12	Revisão de resposta ao tratamento de reexposição à platina das pacientes testadas por <i>SNP array</i>	76
Tabela 13	Taxa de resposta à reexposição à platina de acordo com pontuação dos escores de deficiência da via da recombinação homóloga	78
Tabela 14	Taxa de resposta à reexposição à platina de acordo com características clínicas.....	87
Tabela 15	Pontuação dos escores de deficiência da via da recombinação homóloga de acordo com momento de coleta da amostra de tumor.....	89
Tabela 16	Comparação da pontuação dos escores entre as duas amostras da mesma paciente.....	90

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

aCGH	<i>Comparative Genomic Hybridization array</i>
AKT	<i>V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1</i>
ARID1A	<i>AT-rich domain-containing protein 1A</i>
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>
ATR	<i>Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein</i>
BAF	<i>B allele frequency</i>
BARD1	<i>BRCA1-associated RING domain protein 1</i>
BER	Reparo por excisão de bases
BRAF	<i>v-RAF murine sarcoma viral oncogene homolog B</i>
BRCA1	<i>Breast Cancer 1</i>
BRCA2	<i>Breast Cancer 2</i>
BRIP1	<i>BRCA interacting protein 1</i>
Cb	Carboplatina
CCC	Carcinoma de células claras renais
CDDP	Cisplatina
ChAS	<i>Chromosome Analysis Suite</i>
CHK1	<i>Checkpoint kinase 1</i>
CHK2	<i>Checkpoint kinase 2</i>
CID	Código Internacional de Doenças
cnLOH	Perda de heterozigose com número de cópias normal
cnLOH+L	Escore de perda de heterozigose
Cr	Cromossomo
CTbP	<i>C terminal binding protein 1</i>
CTiP	<i>CTb interacting protein</i>
CTNNB1	<i>Catenin beta 1</i>
delLOH	Perda de heterozigose com deleção
DLP	Doorrubicina lipossomal
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>

EPCAM	<i>Epithelial cell adesion molecule</i>
FANCN	Gene da anemia de Fanconi N
FIGO	Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia
GCIG	<i>Gynecology Cancer International Group</i>
H2AX	Família de histone H2A membro X
HBOC	<i>Hereditary Breast and Ovarian Cancer Syndrome</i>
HER2	<i>Human Epidermal Growth Factor Receptor 2</i>
HGSC	Carcinoma seroso de alto grau
HNF-1BETA	<i>Hepatocyte nuclear factor 1 homeobox B</i>
HR	Recombinação homóloga
HRD	Escore de deficiência de recombinação homóloga
ID	Identificação
IDH1	Isocitrato desidrogenase 1
IDH2	Isocitrato desidrogenase 2
KRAS	<i>Kristen rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
LOH	Perda de heterozigose
LST	<i>Large scale transition</i>
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
MDC1	<i>Mediator of DNA damage checkpoint protein 1</i>
MIP	<i>Molecular Inversion Probe</i>
MLH1	<i>MutL homolog 1</i>
MLPA	<i>Multiplex Ligation –dependent probe amplification</i>
MMR	<i>Mismatch repair</i>
MSH2	<i>MutS protein homolog 2</i>
MSH6	<i>MutS protein homolog 2</i>
NBN	<i>Nibrin</i>
NCCN	<i>National Comprehensive Cancer Network</i>
NER	Reparo por excisão de nucleotídeos
NHEJ	<i>Non-homologous end-joining</i>
Ni	Não informado
NRAS	<i>Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog</i>
PALB2	<i>Partner and loalizer of BRCA2</i>

PARP	PoliADP ribose polimerase
PARPi	Inibidor de PoliADP ribose polimerase
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PD	Progressão de doença
PET	Tomografia por emissão de positrons
PIK3CA	Subunidade catalítica da fosfatidilinositol 4,5 bifosfato quinase
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
qPCR	<i>real-time PCR</i>
RB	<i>Retinoblastoma gene</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RNF8	<i>Ringer finger protein 8</i>
RP	Resposta parcial
SGdiagn	Sobrevida global a partir do diagnóstico
SGplatR	Sobrevida global a partir do tratamento de doença platina resistente
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Science</i>
SUV	<i>Standardized Uptake Value</i>
TAI	Escore de alelos não balanceados
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
TOPBP1	<i>Topoisomerase 2 binding protein 1</i>
UC	Carcinoma indiferenciado
VUS	Variante de significado incerto
WT1	<i>Wilms tumor 1</i>

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Epidemiologia e Fatores de Risco.....	1
1.2	Subtipos Histológicos e Alterações Moleculares.....	2
1.2.1	Carcinoma Seroso de Alto Grau	3
1.2.2	Carcinoma Endometrióide	4
1.2.3	Carcinomas de Células Claras.....	5
1.2.4	Carcinoma Mucinoso	6
1.2.5	Carcinoma Seroso de Baixo Grau.....	7
1.3	Estadiamento e Tratamento do Câncer de Ovário	9
1.3.1	Estadiamento.....	9
1.3.2	Procedimento Cirúrgico no Câncer de Ovário.....	9
1.3.3	Quimioterapia na Doença Inicial	10
1.3.4	Quimioterapia na Doença Avançada.....	11
1.3.5	Doença Recidivada	12
1.4	Câncer de Ovário Hereditário	15
1.4.1	Síndrome de Câncer Mama-Ovário Hereditário	16
1.4.2	Síndrome de Lynch	21
1.4.3	Mutação Germinativa em Outros Genes Associadas com o Risco de Desenvolvimento do Câncer de Ovário	22
1.5	Vias de Reparo a Danos no DNA: Impacto Prognóstico e Tratamento.....	23
1.5.1	Via da Recombinação Homóloga (HR) / Anemia de Fanconi.....	24
1.5.2	Inibidores de PARP.....	32
1.5.3	BRCAness.....	34
2	OBJETIVOS.....	38
2.1	Objetivo Primário.....	38
2.2	Objetivos Secundários.....	38

3	MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1	Pacientes.....	39
3.1.1	Critérios de Inclusão	40
3.1.2	Critérios de Exclusão	40
3.2	Dados Clínicos e Desfechos.....	40
3.3	Avaliação das Alterações Genômicas Estruturais.....	42
3.3.1	Material	42
3.3.2	Extração de DNA	42
3.3.3	Análise do perfil de alteração genômicas e mutações utilizando a plataforma Oncoscan (Affymetrix)	43
3.3.4	Cálculo dos escores de deficiência da via da recombinação Homóloga.....	48
3.4	Análise Estatística	52
4	RESULTADOS	53
4.1	Características Clínicas	54
4.2	Características das Amostras Testadas	59
4.3	Alterações Genômicas.....	60
4.4	Pontuação dos Escores de Deficiência da via da Recombinação Homóloga.....	67
4.5	Concordância e Correlação entre os Escores de Deficiência da via da Recombinação Homóloga	75
4.6	Avaliação de Resposta	76
4.7	Associação entre os Escores de Deficiência da via da Recombinação Homóloga e Resposta ao Tratamento de Reexposição à Platina	77
4.8	Associação entre os escores de deficiência da Via da recombinação homóloga e sobrevida global	81
4.9	Associação Fatores Clínico Patológicos com Escores de Deficiência da via de Recombinação Homóloga e Resposta ao Tratamento.....	83
4.10	Comparação entre os Escores de Deficiência da via de Recombinação Homóloga em Tumores Primários e Recidivas e entre duas Amostras de uma mesma Paciente.....	87
5	DISCUSSÃO.....	91

6	CONCLUSÃO	110
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	112

ANEXOS

- Anexo 1** Carta de aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa-CEP
- Anexo 2** Ficha de Coleta de Dados – Ovário
- Anexo 3** Artigos
- Anexo 4** Tabelas suplementares
- Anexo 5** Log₂ ratio e frequência do alelo B em uma visão do genoma completo de cada amostra testada pelo ensaio ONCOSCAN
- Anexo 6** Tabelas com resultados do ensaio ONCOSCAN descrevendo as alterações segmentares encontradas em cada amostra

1 INTRODUÇÃO

1.1 EPIDEMIOLOGIA E FATORES DE RISCO

Em 2012, o câncer de ovário foi estimado como sendo a sétima neoplasia mais frequente entre as mulheres no mundo com 238.700 novos casos e a oitava em mortalidade entre as mulheres com 151.900 óbitos ao ano (TORRE et al. 2015). Nos Estados Unidos é a décima primeira neoplasia mais frequente entre as mulheres com 22.280 novos casos estimados ao ano em 2016, e a quinta em mortalidade entre as mulheres com 14.240 óbitos estimados ao ano (SIEGEL et al. 2016). A estimativa da incidência no Brasil em 2014 foi de 5.680 casos correspondendo à sétima neoplasia mais frequente entre as mulheres e 2.979 óbitos pela doença (Ministério da Saúde 2014). A idade mediana ao diagnóstico é em torno de 60 anos e o risco de uma mulher desenvolver câncer de ovário ao longo da vida é de 1 a cada 70 mulheres (CANNISTRA 2004).

A origem celular dos carcinomas de ovário ainda não foi totalmente definida. Uma hipótese é que seja originária do epitélio de revestimento do ovário por meio de cistos de inclusões ovarianos e, uma segunda hipótese, é que venha de células das fimbrias da tuba uterina e/ou de células do epitélio Mülleriano extra-uterino. Os casos de câncer diagnosticados como primários de tuba uterina ou peritônio são considerados apresentações distintas de uma mesma doença, recebendo abordagem e tratamento idênticos ao câncer de ovário (GEORGE et al. 2016).

Os fatores de risco descritos para desenvolver o câncer de ovário estão relacionados a um dos quatro mecanismos de carcinogênese propostos: (1) as ovulações contínuas seriam um estímulo para a carcinogênese das células do epitélio de revestimento ovariano; (2) as gonadotrofinas circulantes estimulariam as células epiteliais ovarianas induzindo alterações neoplásicas; (3) um estímulo direto dos hormônios sexuais, de forma que os hormônios estrogênicos e androgênicos induziriam e os progestágenos inibiriam a carcinogênese; (4) estímulos inflamatórios relacionados a própria ovulação ou doenças ginecológicas como a endometriose e a doença inflamatória pélvica (HUNN e RODRIGUEZ 2012).

Os fatores que aumentam o risco de câncer de ovário são a nuliparidade, infertilidade, menarca precoce, menopausa em idade mais avançada, exposição perineal a talco, endometriose e doença inflamatória pélvica. Os fatores que diminuem o risco de câncer de ovário incluem a multiparidade, amamentação, uso de contraceptivos orais, cirurgia de ligadura tubária e histerectomia mesmo sem ooforectomia ou salpingectomia (HUNN e RODRIGUEZ 2012). Porém, o fator com maior impacto no risco de câncer de ovário é a história familiar de câncer de ovário ou câncer de mama.

1.2 SUBTIPOS HISTOLÓGICOS E ALTERAÇÕES MOLECULARES

Os cânceres epiteliais representam 95% dos cânceres de ovário, os outros 5% são tumores de células germinativas ou tumores de células estromais. Dentre os cânceres epiteliais de ovário há alguns subtipos que diferem entre si pela morfologia

e alterações moleculares características. O mais comum é o seroso de alto grau correspondendo a 70% dos casos, seguido pelo endometrióide (10% dos casos), células claras (10% dos casos), mucinosos (2-4% dos casos), serosos de baixo grau (< 5% dos casos) e outros ainda mais raros como carcinoma de células transicionais, carcinosarcoma e carcinoma de pequenas células (PRAT 2012; RESCIGNO et al. 2013).

1.2.1 Carcinoma seroso de alto grau

Os carcinomas serosos de alto grau são os tumores epiteliais de ovário são responsáveis por 90% dos óbitos pela doença. Apenas 1% dos casos é restrito ao ovário ao diagnóstico e a sobrevida global em 5 anos para pacientes com estágio IIIC é de apenas 25-30% e para as pacientes com estágio IV de 10-15% (RESCIGNO et al. 2013; GURUNG et al. 2013).

A principal alteração molecular dessas neoplasias é a grande instabilidade genética com muitas alterações do número de cópias do DNA e poucas mutações em ponto (The Cancer Genome Atlas Research Network-TCGA 2011). Isso é consequência da presença de mutações somáticas do *TP53* em relatada em 97% dos casos (TCGA 2011). A proteína p53 é responsável pela regulação do ciclo celular, reparo do DNA e indução da apoptose de forma que a perda da sua função favorece a instabilidade genética. Há uma boa correlação entre a presença de mutações do *TP53* e alterações da expressão da proteína por imunohistoquímica. As mutações *missense* causam um acúmulo da proteína no núcleo celular e as mutações *nonsense* causam uma perda de expressão completa da proteína (GURUNG et al. 2013).

As alterações da via de reparo do DNA da recombinação homóloga também

favorecem a presença de instabilidade genética. Alterações desta via estão presentes em até 50% dos casos podendo ocorrer por mutações germinativas do *BRCA1* e *BRCA2* em aproximadamente 15% dos casos, mutações somáticas e silenciamento epigenético do *BRCA1* e *BRCA2* em 14 a 22% e, em menor frequência, por outras alterações de proteínas ligadas a esta via: amplificação do *EMSY* (8% dos casos), deleção do *PTEN* (7% dos casos), hipermetilação do *RAD51C* (2% dos casos) e outros mecanismos ainda mais raros (TCGA 2011; MITTEMPERGHER 2016).

Foram descritas aproximadamente 100 diferentes regiões de amplificação ou deleção em câncer de ovário (TCGA 2011; MITTEMPERGHER 2016). Cada uma destas regiões contém mais de um gene, o que torna difícil identificar os principais genes afetados. A análise das vias de sinalização intracelular alteradas mostrou o envolvimento das vias da proteína do retinoblastoma (RB), fosfatidilinositol 3 fosfato (PI3K) / RAS, NOTCH e FoxM1 (TCGA 2011; MITTEMPERGHER 2016).

1.2.2 Carcinoma endometrióide

Os carcinomas endometrióides correspondem a 10% dos cânceres epiteliais do ovário. O tumor é bilateral em 28% dos casos e entre 15 a 20% está associado com a presença de um segundo tumor primário de endométrio. São tumores caracteristicamente de baixo grau. Os carcinomas de endométrio de alto grau são morfológicamente indistinguíveis do carcinoma de ovário do tipo seroso de alto grau, além de expressarem WT1 (um marcador dos tumores serosos) e de apresentarem perfil de expressão gênica semelhante. Estes dados sugerem que os tumores endometrióides de alto grau não são diferentes dos serosos de alto grau (PRAT 2012; GROEN et al. 2015). É um subtipo sensível à quimioterapia e com melhor

prognóstico quando comparado com os serosos de alto grau nos estágios avançados (MACKAY et al. 2010).

Segundo a origem do tumor, há dois tipos de carcinoma endometrióide: os relacionados à endometriose; em aproximadamente 42% de todos os tumores endometrióides de ovário há evidência de endometriose, e aqueles não relacionados à endometriose. Apesar disso não há diferença entre eles quanto ao prognóstico (MANGILI et al. 2012).

A alteração molecular mais comum nestes tumores endometrioides é a presença de mutações do *CTNBI*, as quais estão presentes em 38 a 50% dos casos. Este gene codifica a proteína beta catenina, o produto do gene mutado é insensível a sua degradação o que leva ao acúmulo de beta catenina nuclear. A segunda via mais frequentemente alterada é do PI3K-AKT, com mutações do *PTEN* e do *PIK3CA*, descritas em 20% dos casos cada. Outra alteração característica é a presença de mutações do *ARIDIA* (30% dos casos) e do *PPP2RIA* (12%), que são alterações encontradas nos focos de endometriose e nos tumores de células claras e que também estão associados à endometriose (PRAT 2012; RESCIGNO et al. 2013; GROEN et al. 2015).

O subtipo endometrióide e o células claras estão mais frequentemente associados à síndrome de Lynch, com alguns casos apresentando instabilidade de microssatélites(12 a 19% dos casos) (PRAT 2012; GROEN et al. 2015).

1.2.3 Carcinoma de células claras

Os carcinomas de ovário de células claras (10% dos tumores epiteliais) são diagnosticados em idade mais jovem, em torno de 54 anos e mais frequentemente em

estágios I e II (57-80% dos casos) quando comparados aos serosos. Em aproximadamente metade dos casos o tumor se origina de focos de endometriose. Nestes casos, o prognóstico é melhor do que aqueles não associados à endometriose. São neoplasias resistentes à quimioterapia convencionalmente utilizada para tratar os carcinomas de ovário e, ao menos nos estágios mais avançados, já é bem estabelecido que apresentam uma pior sobrevida global quando comparados aos tumores serosos de alto grau (DEL CARMEN et al. 2012; PRAT 2012; GURUNG et al. 2013; YAMASHITA 2015).

As alterações moleculares apresentam algumas semelhanças com os tumores endometrióides, com mutações do *ARID1A* (em 50% dos casos), *PIK3A* (43%) e *PPP2RIA* (4-7%). Aproximadamente 10% dos casos tem deficiência das proteínas da via de *mismatch repair*. Outras alterações mais específicas descritas nos tumores de células claras são a expressão aumentada do fator de crescimento de hepatócito HNF-1Beta (> 90% dos casos) a qual pode ser usada como marcador diagnóstico e alterações das vias relacionadas à angiogênese e hipóxia, à semelhança dos tumores de células claras renais (STANY et al. 2011; GURUNG et al. 2013; YAMASHITA 2015).

1.2.4 Carcinoma mucinoso

Os carcinomas mucinosos do ovário são um subtipo raro, representando apenas 2 a 4% dos tumores de ovário. Mais de 80% dos casos são diagnosticados no estágio I, quando o prognóstico é excelente, com sobrevida de 90% em 5 anos. Porém trata-se de um tumor resistente à quimioterapia e, quando diagnosticado em

estágios avançados, o prognóstico é pior que dos serosos de alto grau (FRUMOVITZ et al. 2010; MACKAY et al. 2010; XU et al. 2016).

Dentre as alterações moleculares descritas neste subtipo tumoral, a mais comum é a mutação do *KRAS* (50-75% dos casos), seguido por amplificação do *HER2* (15-18%). Estas alterações são mutuamente excludentes. As mutações do *TP53* características dos tumores serosos ocorrem em apenas 16% dos casos (FRUMOVITZ et al. 2010; KELEMEN e KOBEL 2011; GURUNG et al. 2013; GROEN et al. 2015; XU et al. 2016).

1.2.5 Carcinoma seroso de baixo grau

Os tumores serosos de baixo grau foram recentemente descritos como uma entidade totalmente diferente dos serosos de alto grau, correspondendo a menos de 4% dos tumores epiteliais de ovário. São muitas vezes associados com tumores *borderline* de ovário, frequentemente diagnosticados em estágios mais avançados e com uma evolução bastante indolente (ROMERO et al. 2013; GURUNG et al. 2013).

As alterações moleculares são totalmente diferentes daquelas descritas nos carcinomas serosos de alto grau, apresentando baixa frequência de mutações do *TP53* e do *BRCA* e com alterações da via da MAPK em até 70% dos casos. A prevalência de mutações de *KRAS* é de até 54% dos casos e de *BRAF* em 2-35% dos casos. Além disso, mutações de *HER2* são encontradas em 8% dos casos. São tumores resistentes aos tratamentos convencionais. Drogas alvos direcionadas contra a via da MAPK já foram testadas em estudos clínicos com uma taxa de resposta em torno de 15% sendo identificados alguns tipos de mutações em *MAP2K1* capazes de identificar pacientes com resposta prolongada ao tratamento (GRISHAM et al. 2015).

Tabela 1 - Síntese das principais alterações moleculares relacionadas aos diversos subtipos de câncer de ovário epitelial.

Histologia	Tipo de alteração	Descrição	Frequência	Referência
Seroso de alto grau	Mutações	<i>TP53</i>	97%	TCGA 2011, Gurung et al. 2013
		<i>BRCA</i> germinativa	15-20%	TCGA 2011, Pennington et al. 2014, Gurung et al. 2013
		<i>BRCA</i> somática	3 - 9%	TCGA 2011, Pennington et al. 2014
	Outros	Silenciamento epigenético <i>BRCA</i>	11-18%	Press et al. 2008, TCGA 2011, Gurung et al. 2013
		Deleção <i>PTEN</i>	7%	TCGA 2011, Gurung et al. 2013
		Hipermetilação <i>RAD51</i>	2%	TCGA 2011, Gurung et al. 2013
Endometrióide	Mutações	Amplificação <i>EMSY</i>	8%	TCGA 2011
		<i>CTNNB1</i>	38-50%	Catusús 2004, Prat et al. 2012
		<i>PTEN</i>	20%	Catusús 2004, Prat et al. 2012
		<i>PIK3CA</i>	20%	Prat J 2012
		<i>PPP2RIA</i>	30%	McConechy 2011, Prat et al. 2012
	<i>ARID1A</i>	12%	Wiegand 2010, Prat et al. 2012	
Outros	Deficiência de MMR	12-19%	Prat et al. 2012	
Células Claras	Mutações	<i>ARID1A</i>	50%	Jones et al. 2010, Wiegand et al. 2010, Stany et al. 2011
		<i>PIK3CA</i>	43%	Kuo 2009 et al., Stany et al. 2011
		<i>PPP2RIA</i>	4-7%	McConechy et al. 2011, Stany et al. 2011
	Outros	Deficiência de MMR	10%	Stany et al. 2011
Mucinoso	Mutações	<i>KRAS</i>	50-75%	Gemingnani et al. 2003, Mayr et al. 2006
		<i>TP53</i>	16%	Frumovitz et al. 2010, Kelemen et Kobel 2011, Anglesio et al. 2012
	Outros	Amplificação <i>HER2</i>	15-18%	McAlpine et al. 2012
Seroso de baixo grau	Mutações	<i>KRAS</i>	54%	Singer et al. 2003, Romero I et al. 2013
		<i>BRAF</i>	2-35%	Singer et al. 2003, Romero I et al. 2013
		<i>HER2</i>	8%	Romero I et al. 2013, Gurung et al. 2013

1.3 ESTADIAMENTO E TRATAMENTO DO CÂNCER DE OVÁRIO

1.3.1 Estadiamento

O sistema de estadiamento mais utilizado para o câncer de ovário é o da Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO). O estágio **I** inclui doença restrita ao ovário, IA, unilateral, IB, bilateral, IC, com acometimento da superfície ovariana, ruptura de cápsula ovariana ou lavado peritoneal positivo; **II**, doença restrita à pelve. IIA, extensão para tubas uterinas ou útero, IIB, extensão para outros órgãos pélvicos ou peritônio pélvico, IIC, extensão pélvica com lavado peritoneal positivo. **III**, doença com extensão para cavidade peritoneal. IIIA doença microscópica, IIIB, doença macroscópica menor que 2cm, IIIC, doença macroscópica maior que 2cm ou linfonodos comprometidos. Estágio **IV** com doença extra cavidade peritoneal, o que inclui o acometimento do parênquima hepático e derrame pleural neoplásico (EDGE et al. 2010).

1.3.2 O procedimento cirúrgico no câncer de ovário

Em todos os estágios, o pilar do tratamento é a cirurgia. A cirurgia para o câncer de ovário tem papel diagnóstico, de estadiamento e terapêutico. O procedimento mínimo para uma cirurgia ser considerada adequada, via de regra, envolve: histerectomia total, salpingo-ooforectomia bilateral, linfadenectomia pélvica e retroperitoneal, omentectomia, biópsias do peritônio e lavado peritoneal. Em algumas situações bastante particulares pode-se optar por não realizar algum desses procedimentos, como é o caso, por exemplo, das cirurgias com conservação

de fertilidade. Em caso de doença pélvica e peritoneal, o objetivo da cirurgia é retirar toda a doença visível, com ressecção de todos os implantes visíveis. Essa cirurgia é denominada de citorredução (FADER e ROSE 2007).

A citorredução pode ser classificada quanto ao volume de doença residual (microscópica: citorredução completa e macroscópica) e quanto ao momento do tratamento. Até há alguns anos atrás a citorredução com doença residual menor que 10mm era considerada o objetivo do tratamento sendo denominada citorredução ótima e aquelas com doença residual maior que 10mm chamadas de citorredução subótima. A citorredução completa confere um prognóstico melhor do que citorredução com doença residual macroscópica mesmo em relação aquelas pacientes com doença residual com volume menor que 10mm. Por isso hoje o termo *citorredução ótima* deve ser empregado para os caso que chegam a doença residual microscópica. Este é um dos principais fatores prognósticos juntamente com estágio e subtipo histológico da paciente, sendo o único modificável pelo tratamento (DU BOIS et al. 2009; CHANG et al. 2013). Quanto ao momento da citorredução ela pode ser classificada como primária quando realizada antes do tratamento de quimioterapia, citorredução de intervalo, quando é realizada imediatamente após alguns ciclos de quimioterapia, e secundária quando é realizada no momento da recidiva da doença (FADER e ROSE 2007).

1.3.3 Quimioterapia na doença inicial

Aproximadamente 25% das pacientes são diagnosticadas em estágio inicial (estágios I a IIA). Nesses casos, o tratamento após a cirurgia é realizado com quimioterapia baseada em platina por 4 a 6 ciclos nas pacientes com estágio IC em

diante e grau 3. A indicação de quimioterapia é controversa nos estágios IB e G2 e para pacientes com tumores de células claras e mucinosos estágio IA e IB. O diagnóstico de tumores mucinoso e de células claras era critério de elegibilidade para o estudo de fase III, o qual demonstrou o benefício da quimioterapia adjuvante. Entretanto, análises posteriores mostraram que esses subtipos histológicos quando nos estágios IA e IB têm um bom prognóstico (TRIMBOS et al. 2003). Há pelo menos um estudo avaliando diretamente o número de ciclos de quimioterapia necessários que mostrou que 6 ciclos são melhores que 3 ciclos, especialmente nos carcinomas serosos de ovário (CHAN et al. 2010). Essas pacientes tem um prognóstico de bom a moderado de acordo com os fatores risco como a idade da paciente, grau histológico e estágio da doença. Além disso, as pacientes, também apresentam uma sobrevida livre de progressão em 5 anos de 62%-88% e sobrevida global em 5 anos de 75-88% (CHAN et al. 2008; PARK et al. 2012).

1.3.4 Quimioterapia na doença avançada

Aproximadamente 75% das pacientes são diagnosticadas com doença avançada (estágio IIB a IV). Nesses casos o tratamento após citorredução é quimioterapia baseada em platina. O esquema de quimioterapia tradicionalmente realizado após a cirurgia é a associação de carboplatina com paclitaxel que se mostrou superior aos esquemas anteriores de combinações de platina com agentes alquilantes como a ciclofosfamida (MCGUIRE et al. 1996; PICCART et al. 2000) e tão eficazes quanto e menos tóxicos que a combinação de cisplatina e paclitaxel (OZOLS et al. 2003; DU BOIS et al. 2003). Há evidências de outras combinações de platina tão eficazes como esta que podem ser uma opção alternativa de tratamento

principalmente levando-se em consideração o perfil de efeitos adversos. Estas outras drogas que podem ser combinadas com a carboplatina são o docetaxel ou doxorrubicina lipossomal, ao invés do paclitaxel (VASEY et al. 2004; PIGNATA et al. 2011).

Apesar do uso da quimioterapia, o prognóstico das pacientes com doença avançada é ruim, especialmente para pacientes com estágio IIIC e IV com sobrevida global em 5 anos de acordo com estágio: IIB - 70,2%, IIC – 64,1%, IIIA – 52%, IIIB – 45,2%, IIIC – 32,1% eIV – 15,3% (EDGE et al. 2010).

Há ao menos 3 alternativas de tratamento para pacientes com doença avançada com resultados em estudos de fase III melhores que a combinação de carboplatina e paclitaxel: o esquema de carboplatina e paclitaxel em dose densa KATSUMATA et al. (2009), KATSUMATA et al. (2013) a associação de bevacizumabe às duas drogas BURGER et al. (2011), PERREN et al. (2011) e a quimioterapia intraperitoneal (ALBERTS et al. 1996; MARKMAN et al. 2001; ARMSTRONG et al. 2006; TEWARI et al. 2015). Os estudos de fase III mais recentes tentaram comparar as diferentes combinações dessas três opções de tratamento e não mostraram até o momento benefício de uma em relação a outra, permanecendo as três opções, carboplatina e paclitaxel dose densa, quimioterapia intraperitoneal ou associação de bevacizumabe à quimioterapia, como possibilidades de tratamento padrão (CHAN et al. 2016).

1.3.5 Doença Recidivada

A doença recidivada pode ser dividida em três cenários de acordo com o intervalo livre de platina, definido como o tempo entre a última aplicação de

quimioterapia com platina e a recidiva da doença. Caso a recidiva ocorra em menos de 6 meses a doença é considerada platina resistente/refratária. A doença refratária é considerada quando a progressão ocorre durante o tratamento (10% dos casos), resistente caso ocorra após o término do tratamento (30% dos casos); platina sensível caso ocorra após 12 meses e com sensibilidade intermediária a platina caso ocorra entre 6 e 12 meses (50-55% dos casos com sensibilidade intermediária ou completa). Quanto menor esse intervalo, menor a taxa de resposta ao re-tratamento com um esquema com platina, sendo esperadas taxas de resposta de 0% para platina refratária, 10% para platina resistente, 30-40% para sensibilidade intermediária e superior a 60% para platina sensível (COLOMBO et al. 2014).

A) Doença platina sensível e com sensibilidade intermediária

Nas pacientes com recidiva platina sensível uma opção a ser discutida é a citorredução de intervalo. Não há evidência baseada em estudo de fase III sobre o seu benefício. Apesar disso, esta é uma opção que pode ser considerada em pacientes selecionadas (AL RAWAHI et al. 2013).

A quimioterapia é o tratamento fundamental neste cenário e tem intuito paliativo. A combinação de mais de um agente quimioterápico é melhor que a monoterapia. As opções aceitáveis são (1) a re-exposição ao esquema de carboplatina e paclitaxel, (2) variações deste esquema com uso de cisplatina ao invés de carboplatina ou de docetaxel no lugar de paclitaxel, ou (3) outros esquemas com platina que pode ser combinada com gencitabina ou doxorrubicina lipossomal. Não há diferença na sobrevida global com nenhum destes esquemas e a escolha depende

do perfil de efeitos adversos desejado e da tolerância da paciente (AL RAWAHI et al. 2013; ELIT e HIRTE et al. 2013).

Mais recentemente alternativas que levam a uma melhor sobrevida livre de progressão para essas pacientes incluem o uso de agentes anti-angiogênicos como bevacizumabe e pazopanibe em combinação com a quimioterapia e/ou manutenção após a quimioterapia (AGHAJANIAN et al. 2012, 2015; MONK et al. 2013), bem como o uso de inibidores de PARP como tratamento de manutenção após a quimioterapia (LEDERMANN et al. 2012; OZA et al. 2013; LEDERMANN et al. 2014; COLEMAN et al. 2015; MATULONIS et al. 2016).

B) Doença platina resistente

Pacientes com doença platina resistente têm um prognóstico ruim, com uma sobrevida global mediana em torno de 1 ano e taxas de resposta à quimioterapia em torno de 10%. Para essas pacientes o tratamento paliativo deve ser feito com monoquimioterapia, sendo opções de tratamento o uso de gencitabina, doxorubicina lipossomal, topotecano e paclitaxel semanal (COLOMBO et al. 2014). Um alternativa descrita é o acréscimo do bevacizumabe à quimioterapia, o qual revelou um aumento da taxa de resposta e da sobrevida livre de progressão (PUJADE-LAURINE et al. 2014; POVEDA et al. 2015).

Em pacientes com recidiva platina resistente não há evidência do benefício da reexposição à platina (LORTHOLARY et al. 2012), porém alguns estudos sugerem que um subconjunto de pacientes pode se beneficiar do acréscimo de platina

especialmente após um tempo em tratamento com esquemas sem platina (KAVANAGH et al. 1995; SEE et al. 2005).

1.4 CÂNCER DE OVÁRIO HEREDITÁRIO

Aproximadamente 10 a 15% dos cânceres de ovário epiteliais são hereditários e ocorrem em pacientes com mutações germinativas em genes de alta penetrância. A principal síndrome hereditária relacionada ao câncer de ovário é a síndrome de câncer de mama e ovário hereditário (HBOC, do inglês *Hereditary Breast and Ovary Cancer*), que ocorre pelas mutações germinativas em genes de reparo a danos no DNA da via da recombinação homóloga (HR), *BRCA1* e *BRCA2* (LYNCH et al. 1971; NAROD et al. 1991; MIKI et al. 1994; FORD et al. 1998; de PAUW et al. 2012; NAKONECHNY et al. 2016).

A segunda síndrome hereditária reconhecida é a Síndrome de Lynch identificada em 1% das pacientes com câncer de ovário. Mutações germinativas mais raras, responsáveis por menos de 1% dos cânceres de ovário, ocorrem em outros genes relacionados ao reparo do DNA: mutações do *RAD51C*, *RAD51D*, *BARD1*, *BRIP1*, *MRE11A*, *NBN*, *RAD50* e *FANCN/PALB2* (de PAUW et al. 2012; STECKLEIN e JENSEN 2012; NAKONECHNY et al. 2016).

1.4.1 Síndrome de câncer mama-ovário hereditário

A) Características clínicas

As mutações germinativas nos genes *BRCA1* ou *BRCA2* estão presentes em menos de 10% das pacientes com câncer de mama e 10 a 15% dos casos de câncer de ovário (TCGA 2011).

Os cânceres de ovário relacionados às mutações do *BRCA* ocorrem em mulheres mais jovens, com uma idade mediana ao diagnóstico de 49 a 53 anos para *BRCA1* e 55 a 58 anos para o *BRCA2*, contra 63 anos na população geral (MEIJERS-HEIJBOER et al. 2000; MIESFELDT et al. 2013). A presença destas mutações está associada a um melhor prognóstico quando comparadas com pacientes que apresentam os alelos selvagens (BOLTON et al. 2012). Os adenocarcinomas de ovário hereditários relacionados a mutações nos genes *BRCA* são morfológicamente semelhantes aos demais. Há uma prevalência maior de mutações germinativas do *BRCA* entre os tumores serosos de alto grau, porém essas mutações germinativas também foram detectadas em pacientes com adenocarcinomas endometrióides, de células claras e em subtipos mais raros como os de células transicionais e carcinosarcomas. A frequência de tumores mucinosos entre pacientes portadoras de mutação parece ser menor que na população geral, ainda que alguns casos já tenham sido detectados em pacientes com este subtipo histológico (ZHANG et al. 2011; LIU G et al. 2012, LIU J et al. 2012; de PAUW et al. 2012; NAKONECHNY et al. 2016).

As pacientes com história familiar e pessoal sugestiva de HBOC devem ser encaminhadas para aconselhamento genético e discussão da realização do teste

genético diagnóstico. O ponto de corte para indicar a realização do teste não é rígido e a discussão com a paciente é fundamental nesta decisão. Neste cenário, dentre vários critérios de suspeição, o simples diagnóstico de câncer epitelial de ovário em uma paciente independente da sua história familiar já a coloca com uma probabilidade alta de ser portadora de mutações germinativas do *BRCA* e é uma indicação de realizar o teste genético (National Comprehensive Cancer Network-NCCN 2014).

B) Diagnóstico

Existem centenas de alterações conhecidas nos genes *BRCA1* e *BRCA2* (CLINVAR 2016). A maioria delas é do tipo mutação em ponto de troca de nucleotídeos do tipo *nonsense* ou deleções de uma sequência pequena de nucleotídeos que geram formas truncadas das proteínas, ou com menor frequência, mutações *missense* que geram formas inativas da proteína. Há ainda uma parcela menor das alterações que são rearranjos grandes, como a deleção ou amplificação de um ou mais éxons. A prevalência de rearranjos grandes em relação às mutações em ponto varia muito nos trabalhos de acordo com o risco clínico de ser portador de mutações do *BRCA* e da etnia estudada. Um estudo contendo um grande número de pacientes (aproximadamente 40 mil) detectou esses rearranjos em 9,9% das mutações de *BRCA1* e *BRCA2* na população considerada de alto risco para ser portadora de mutações germinativas do *BRCA* e em 5,9% das mutações na população sem risco elevado. Um segundo estudo confirmou esta frequência identificando rearranjos como 6,4% das alterações de *BRCA* (EWALD et al. 2009; JUDKINS et al. 2012; KWONG et al. 2015).

O método para se detectar as mutações nestes genes de predisposição hereditária varia de acordo com a população estudada. Pacientes com ancestrais da família judia Ashkenazi podem fazer um teste direcionado para as três mutações em ponto fundadoras nesse grupo. Pacientes da população geral e sem mutação conhecida na família fazem o sequenciamento dos produtos de amplificação pela PCR de todos os éxons do *BRCA1* e *BRCA2*, regiões de junções intron-exon e regiões reguladores do gene. A indicação da pesquisa dos rearranjos é controversa, podendo ser indicada apenas para pacientes inicialmente de alto risco que não tem nenhuma mutação em ponto detectada ou para pacientes de alto risco já no início do rastreamento junto com a pesquisa das mutações em ponto (PETRUCELLI et al. 1998; BALMAÑA et al. 2009). Para pesquisar esses grandes rearranjos há vários métodos disponíveis, sendo os mais comumente usados oMLPA (do inglês, *multiplex ligation-dependent probe*) ou qPCR (do inglês, *real-time polymerase chain reaction*). As técnicas mais modernas, como o sequenciamento de alto desempenho permitem detectar tanto as mutações em ponto quanto os rearranjos genômicos (KANG et al. 2016).

Os resultados dos testes são classificados em verdadeiros negativos, quando a paciente pertence a uma família portadora de uma mutação deletéria conhecida e que não foi detectada no teste da paciente; e positivo, quando é detectada alguma das várias mutações deletérias ou patogênicas já bem caracterizadas. Há ainda a possibilidade de se detectar uma variante de significado incerto (VUS, do inglês, *variants of uncertain significance*), definida como uma alteração da sequência de pares de base, geralmente por troca de um nucleotídeo, que não gera uma forma truncada da proteína. Estas alterações são denominadas VUS por não ter sido

estabelecida a relação entre a alteração da função da proteína e do risco de desenvolver neoplasias (LINDOR et al. 2013).

C) Penetrância

O risco de uma portadora de mutação deletéria de *BRCA1* desenvolver câncer de ovário até os 70anos de idade é de 39 a 59%,e de *BRCA2* de 16,5 a 17%. (CHEN e PARMIGIANI 2007).Esta penetrância é influenciada por outros fatores que podem ser ambientais/comportamentais ou outras alterações genéticas (CHEN e PARMIGIANI 2007; MAVADDAT et al. 2013).

Entre os fatores ambientais/comportamentais, o risco para desenvolver câncer de ovário em mulheres portadoras de mutações do *BRCA* é diminuído pelo uso de contraceptivo oral da mesma forma que nas não portadoras (NAROD 2002; WHITTEMORE et al. 2004; MOORMAN et al. 2013). Ao contrário do que nas não portadoras, NAROD et al. (2002) sugeriram que o risco de desenvolver câncer de ovário é aumentado com o aumento do número de gestações, ainda que a idade mais avançada da mãe ao nascimento do último filho continue sendo um fator protetor. Peso, altura, índice de massa corpórea e mudança do peso não parecem estar associados à mudança de risco do desenvolvimento da doença (KOTSOPOULOS et al. 2012).

Entre os fatores genéticos, não parece haver uma relação genótipo fenótipo clara para as diversas variantes encontradas em *BRCA1* e *BRCA2*, da mesma forma que não foram identificadas de forma clara variantes em outros genes modificadoras de penetrância do *BRCA* (PETERLONGO et al. 2015).

D) Rastreamento e condutas redutoras de risco

As condutas a serem tomadas quando diagnosticada uma mutação deletéria em uma paciente envolvem: aconselhamento genético dos familiares, exames de rastreamento com rotina diferente das pacientes não portadoras, cirurgias redutoras de risco e quimioprofilaxia (BALMAÑA et al. 2009; MIESFELDT et al. 2013).

O rastreamento deve ser feito para câncer de mama com auto-exame mensal a partir dos 18 anos, ressonância magnética e mamografia anuais iniciando entre 25 e 30 anos. A ressonância magnética é mais sensível que a mamografia apesar de uma menor especificidade. A associação dos dois métodos chega a uma sensibilidade entre 80 e 100% (SARDANELLI et al. 2007; WARNER et al. 2008). Para o rastreamento do câncer de ovário não há nenhum método comprovadamente eficaz. Apesar disto o NCCN (2014) recomenda o rastreamento com CA 125 e ultrassonografia transvaginal duas vezes ao ano (<http://www.nccn.org>).

As cirurgias redutoras de risco são a mastectomia bilateral/contralateral que é a medida preventiva mais eficaz na redução do risco de câncer de mama (estimada em 90%) e a salpingo-ooforectomia bilateral, que reduz o risco de câncer de ovário e de mama. Estes procedimentos devem ser discutidos com todas as pacientes e o momento da indicação do tratamento geralmente é após os 35 anos quando o risco de câncer de ovário e mama aumentam de forma mais significativa ou quando estiverem com prole constituída (BALMAÑA et al. 2009; MIESFELDT et al. 2013).

1.4.2 Síndrome de Lynch

A síndrome de Lynch, também conhecida como síndrome de câncer colorretal hereditário não polipóide, é causada por mutações dos genes de reparo a danos no DNA da via do *mismatch-repair* (MMR) *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* e *PMS2* que ocorrem em aproximadamente 36%, 38%, 14%, e 15% respectivamente. Uma porcentagem ainda menor dos casos ocorre por mutações do *EPCAM* que levam a um silenciamento epigenético do *MSH2*. Os pacientes com síndrome de Lynch tem um risco aumentado de desenvolver câncer colorretal de 22 a 58% até a idade de 70 anos e adenocarcinoma de endométrio com um risco de 30 a 60% até a idade de 70 anos. Outros cânceres para os quais a síndrome de Lynch predispõe são o câncer gástrico, do trato urinário, hepatobiliar, sistema nervoso central, intestino delgado e pele (WEISSMAN et al. 2012; MIESFELDT et al. 2013; KOHLMANN et al. 2016).

Aproximadamente 2 a 4% das pacientes diagnosticadas com câncer de ovário são portadoras de síndrome de Lynch. Pacientes com síndrome de Lynch têm um risco de desenvolver câncer de ovário de 4 a 12%, com uma mediana de idade de 42,7 anos ao diagnóstico. Vinte e dois por cento são sincrônicos com o câncer de endométrio (WEISSMAN et al. 2012; LU e DANIELS 2013). Os tumores são quase sempre epiteliais, porém em torno de 5% podem ser tumores de células da granulosa ou tumores *borderline*. Em uma análise de 159 tumores epiteliais a distribuição dos subtipos histológicos foi de 32% de tumores serosos, 25% de endometrióides, 14% de células claras, 8% mucinosos e 20% epiteliais sem especificação de subtipo (CHUI et al. 2013). Outros relatos sugeriram uma prevalência maior de mutação destes genes entre os subtipos associados à endometriose, que são os endometrióides e os de células claras (CHUI et al. 2013). Ao contrário dos tipos esporádicos, a

maioria dos tumores é diagnosticado em estágios iniciais (WATSON et al. 2001).

1.4.3 Mutação germinativa em outros genes associadas com o risco de desenvolvimento do câncer de ovário

Outros genes relacionados à via da recombinação homóloga podem levar a uma maior predisposição a desenvolver câncer de ovário. Entre eles estão: *BRIP1*, *RAD51C*, *RAD51D*, *ATM*, *PTEN*, *NBN*, *PALB2*, *MRE11A*. (MINION et al. 2015). Estes genes são considerados de moderada penetrância, e são incluídos nos painéis de genes para suscetibilidade ao câncer de ovário por indicarem algum tipo de mudança de conduta em alguns casos (DESMOND et al. 2015).

Tabela 2 – Síntese das principais mutações germinativas relacionadas ao câncer de ovário

Síndrome ou tumores primários relacionados	Mutação germinativa	Frequência	Subtipo histológico	Referência
HBOC ¹	<i>BRCA1</i>	7,5-9,5%	Epiteliais mucinosos, principalmente seroso de alto grau	Risch et al. (2001), Pal et al. (2005), Zhang et al. (2011)
	<i>BRCA2</i>	4,1-5,6%	Epiteliais mucinosos, principalmente seroso de alto grau	Risch et al. (2001), Pal et al. (2005), Zhang et al. (2011)
Síndrome de Lynch	<i>MLH1</i> , <i>MSH2</i> , <i>MSH6</i> , <i>PMS2</i> e <i>EPCAM</i>	2 a 4%	Epiteliais, células da granulosa e borderline	Daniels et al. (2013)
Mama e ovário	<i>RAD51C</i> , <i>RAD51D</i> , <i>RAD</i>	1-3% ²	Epiteliais mucinosos, principalmente seroso de alto grau	Weissman et al. (2012)
Outros genes da via da anemia de Fanconi	<i>BARD1</i> , <i>BRIP1</i> , <i>PALB2</i> , <i>MRE11A</i> , <i>NBN</i> e <i>RAD50</i>	< 1%	-	Walsh et al. (2011)
Mama	<i>CHEK2</i>	< 1%	-	Cybulski et al. (2004)
Síndrome de Peutz-Jegers	<i>STK11</i>	-	Tumor de células estromais	Folkins et al. (2013)

1- Síndrome de câncer de mama e ovário hereditários
2- Incidência em famílias com alta incidência de câncer de mama e ovário

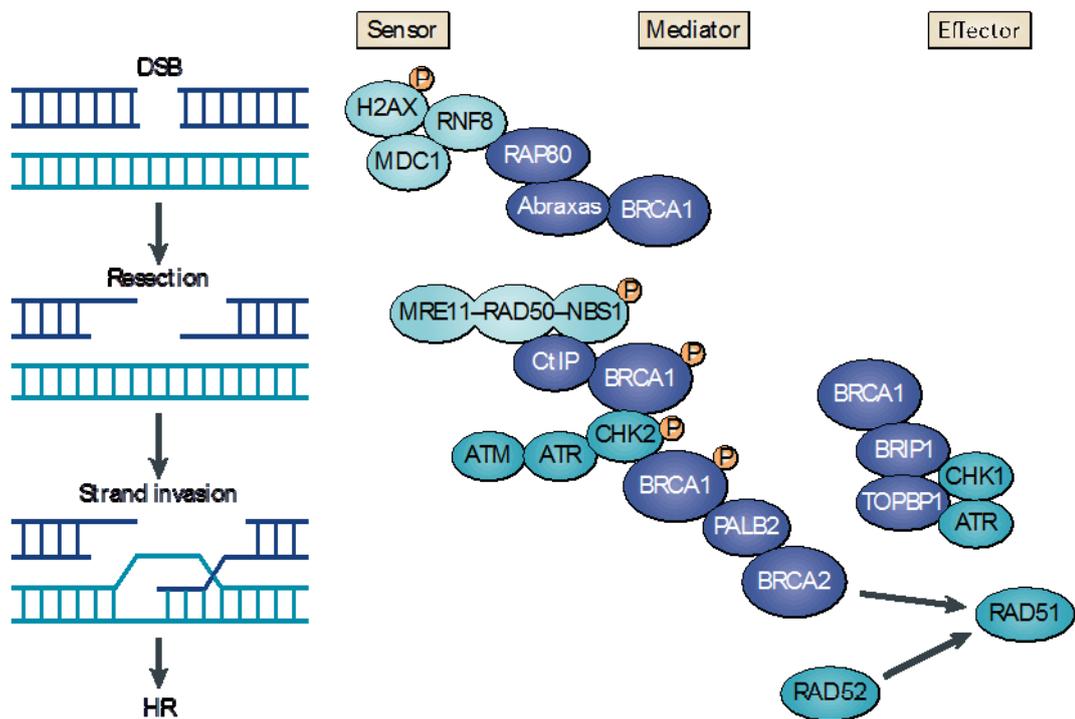
1.5 VIAS DE REPARO A DANOS NO DNA: IMPACTO PROGNÓSTICO E TRATAMENTO

São cinco as principais vias de reparo a danos no DNA. A via de reparo por excisão de nucleotídeos (**NER**) atua no reparo a danos que causam a distorção da hélice do DNA e que interferem no pareamento das bases. Dessa forma, quando esses erros não são reparados ocorre a interrupção da transcrição e a replicação normais. A via do reparo por excisão de bases (**BER**) é responsável por corrigir pequenas alterações nas bases nitrogenadas. Essas alterações geralmente não impedem a transcrição ou a replicação apesar de muitas vezes gerarem erros de codificação. A via do reparo a erros de pareamento (*mismatch repair*, **MMR**) é responsável pela correção de erros de pareamento das bases nitrogenadas e pequenas inserções ou deleções que ocorrem durante a replicação celular. As lesões que causam quebra das duas fitas de DNA são alvo dos outros dois sistemas de reparo: recombinação homóloga (**HR**) e a união terminal não homóloga (**NHEJ**). A HR ocorre preferencialmente na fase S e G2 do ciclo celular quando uma cópia idêntica da dupla fita (cromátide irmã) está disponível para ser usada como molde para a correção do erro. Este é um mecanismo que predispõe menos a novos erros gerados pelo reparo do DNA. O mecanismo NHEJ ocorre na fase G1 do ciclo celular estando associado com maior predisposição a gerar novos erros (HOEIJMAKERS 2001; LORDe ASHWORTH 2012).

1.5.1 Via da recombinação homóloga (HR) / Anemia de Fanconi

A) Componentes da via

A via da recombinação homóloga é composta por três tipos principais de moléculas: as **sensoras** que detectam e sinalizam a lesão na dupla fita do DNA; as **efetoras** que executam o reparo da lesão; e as **mediadoras** que facilitam a interação entre as sensoras e as efetoras. As principais proteínas sensoras são a ATM e ATR, efetoras BRCA2 e RAD51 e mediadoras BRCA1 e CHK2. Há ainda algumas proteínas **facilitadoras** como a PALB2 e BRIP1, Abraxas, CtIP e Rad50, que interagem em diversos pontos da via formando complexos proteicos cujas funções não são completamente esclarecidas. Abaixo representamos, de forma esquemática, a via da recombinação homóloga com a interação de algumas de suas proteínas (ROY et al. 2011; CAESTECKER eVAN DE WALLE 2013).



Fonte: ROY et al. (2011).

Figura 1 – Esquema da via da recombinação homóloga. O BRCA1 e BRCA2 formam parte de alguns complexos proteicos que atuam em diferentes momentos do reparo do DNA. O complexo H2AX, MDC1 e RNF8 sinaliza para a ligação do complexo RAP80-Abraxas-BRCA1 a localização do sítio da lesão de dupla fita do DNA para que ocorra a ligação do BRCA1 ao DNA. O complexo BRCA-CtBP-CtIP se associa ao complexo MRN, composto pelas proteínas MRE11, RAD50 e NBS1, que é responsável pela retirada das bases adjacentes ao sítio da lesão de dupla fita. O complexo ATM-ATR-CHK2 fosforila o BRCA1 no complexo BRCA1-PALB2-BRCA2 que é um complexo efetor por meio da ativação do RAD51. O complexo BRCA1-BRIP1-TOPBP1 também participa do reparo do DNA possivelmente se associando ao complexo CHK1-ATR, porém seu papel ainda não está esclarecido.

A via da HR explica porque as mutações deletérias que levam a perda de função das duas proteínas BRCA1 e BRCA2 causam fenótipos muito semelhantes e que se enquadram na síndrome de câncer de mama e ovário hereditário. Da mesma forma, mutações mais raras como aquelas do *RAD51C*, *BRIP1*, *PALB2* entre outras, podem levar a um fenótipo semelhante ao da HBOC (ROY et al. 2011; CAESTECKER e VAN DE WALLE 2013).

A via das proteínas relacionadas à Anemia de Fanconi tem uma grande interação com a via HR. São ao menos 15 proteínas descritas (FANCA, FANCB, FANCC, FANCD1, FANCD2, FANCE, FANCF, FANCG, FANCI, FANCI, FANCI, FANCI, FANCI, FANCL, FANCM, FANCN, FANCO, e FANCDP) e algumas delas participam de duas vias de reparo como: FANCD1/BRCA2, FANCN/PALB2, FANCI/BRIP1 e FANCO/RAD51C. Oito dessas proteínas formam o complexo central FA que ativa a FANCD2, a proteína efetora da via, que se desloca para formar focos subnucleares nos locais de lesão de DNA onde interage com as outras proteínas da via da HR (D'ANDREA 2013).

B) Alterações relacionadas ao câncer de ovário

O trabalho do TCGA publicado em 2011 relata alterações relacionadas à via da HR em 51% dos casos estudados de carcinomas serosos de alto grau. Entre elas foram identificadas mutações germinativas no *BRCA1* e *BRCA2* em aproximadamente 17% dos casos, mutações somáticas do *BRCA1* e *BRCA2* em 4%, silenciamento epigenético do *BRCA1* em 12%. Outras alterações em genes que fazem parte da via da HR também foram encontradas: hipermetilação do *RAD51C* (3% dos casos), mutação do *ATM* ou *ATR* (2%) e de genes relacionados à anemia de

Fanconi (5%). Além disso, alterações de duas proteínas que não participam diretamente da via, mas são relacionadas à HR também foram detectadas: amplificação do *EMSY* (8), o qual codifica uma proteína que inibe a expressão da proteína BRCA2 e deleção ou mutação do *PTEN*(7%), o qual tem função de regular a transcrição do *RAD51* (TCGA 2011).

C) Mutações germinativas do *BRCA1* e *BRCA2*

Dados em literatura demonstram que pacientes portadoras de mutações germinativas de *BRCA1* e *BRCA2* com o diagnóstico de câncer de ovário tem um melhor prognóstico que as não portadoras e maior sensibilidade ao tratamento com platina (BOLTON et al. 2012; MCLAUGHLIN et al. 2013).

TAN et al. (2008) mostraram uma taxa de resposta de 95,5% contra 59,0% na primeira linha de tratamento baseado em platina e de 91,7% contra 40,9% na primeira recidiva platina sensível para pacientes portadoras de mutações germinativas do *BRCA* quando comparadas com não portadoras (TAN et al. 2008). ALSOP et al. (2012) mostraram que pacientes portadoras de mutações do *BRCA* com recidivas precoces em menos de 6 meses após o tratamento inicial com platina (consideradas como platina resistentes) apresentaram uma taxa de resposta de 80% quando re-tratadas com platina; essa proporção era reduzida para 43,6% nas pacientes não portadoras da mutação. Estes resultados sugeriram que o conceito de resistência à platina pode não se aplicar a essas pacientes, ou ao menos, não no intervalo usado para outras pacientes (ALSOP et al. 2012). Ao menos um estudo sugere que esse benefício existe também para a via de aplicação intraperitoneal (KWA et al. 2014).

O maior estudo que avaliou o impacto prognóstico das mutações germinativas foi de BOLTON et al. (2012). Os autores fizeram uma análise combinada de diversos estudos observacionais que haviam apresentado resultados discrepantes devido, principalmente, à limitação das análises pelo pequeno número de pacientes incluídos em cada estudo. Neste estudo, foram avaliadas 3.879 mulheres com diagnóstico de câncer de ovário, das quais 909 eram portadoras de mutações germinativas do *BRCA1*, 304 de mutações germinativas do *BRCA2*, e 2.666 mulheres não eram portadoras de mutações germinativas nestes dois genes. A sobrevida global em 5 anos foi de 36% para as não portadoras, 44% para as portadoras de mutações do *BRCA1* e 52% para as portadoras de mutações do *BRCA2*. A diferença entre cada grupo de portadoras de mutação e o grupo de não portadoras permaneceu associado a um melhor prognóstico mesmo após ajuste para outros fatores prognósticos conhecidos (BOLTON et al. 2012). Outros estudos confirmaram esse melhor prognóstico a médio prazo para pacientes portadoras de mutação em *BRCA1* e *BRCA2* (SYNOWIEC et al. 2015; HARTER et al. 2016). Apesar deste impacto bem estabelecido quanto ao prognóstico, as pacientes portadoras de mutação germinativa não parecem manter esse benefício em longo prazo conforme uma análise de sobrevida em 10 anos de uma série de pacientes canadenses, sugerindo que a chance de cura é aparentemente a mesma (MCLAUGHLIN et al. 2013; KOTSOPOULOS et al. 2016).

Pacientes portadoras de mutações germinativas do *BRCA2* apresentam características clínicas discretamente diferentes das portadoras de mutação de *BRCA1* e perfis de expressão gênica distintos (GEORGE et al. 2013). Da mesma forma, algumas séries confirmam a sugestão da análise combinada descrita acima de

que as pacientes com mutações do *BRCA2* apresentam um prognóstico ainda melhor que as pacientes com mutações do *BRCA1* (LIU G et al. 2012; LIU J et al. 2012; VENCKEN et al. 2013).

D) Mutações somáticas dos genes *BRCA1* e *BRCA2*

Além das mutações germinativas, uma parcela das pacientes apresenta mutações somáticas em *BRCA1* e *BRCA2*. Dois estudos com 53 e 28 pacientes mostraram que 33% e 39,2% apresentavam mutações somáticas, respectivamente (HENNESSY et al. 2010; DANN et al. 2012). Apesar disto uma série maior com 131 pacientes mostrou apenas 3,8% de mutações somáticas dos genes *BRCA1* e *BRCA2*, resultado este de acordo com TCGA. Segundo este estudo, foram descritas 3% de mutações somáticas no grupo de todas as pacientes avaliadas o que corresponde a aproximadamente 15% das mutações detectadas nos genes *BRCA1* e *BRCA2* (TCGA 2011; MCALPINE et al. 2012). Outros estudos confirmaram esta frequência de mutações somáticas em torno de 4 a 6% (PENNINGTON et al. 2014; MAFFICINI et al. 2016).

A presença das mutações somáticas em *BRCA1* ou *BRCA2* ou outros genes da recombinação homóloga assim como das mutações germinativas nestes genes leva a um melhor prognóstico quando comparado com os pacientes com tumores não mutados nos primeiros 5 anos do diagnóstico (PENNINGTON et al. 2014). ALSOP et al. (2012) relataram ainda que entre 16 mulheres que mantinham resposta ao tratamento com platina após a terceira linha de tratamento, foi detectada mutação somática em quatro delas (25%). Estes dados sugeriram uma prevalência maior de

mutações somáticas entre as pacientes muito sensíveis ao tratamento com platina (ALSOP et al. 2012).

E) Silenciamento epigenético do *BRCA1* e *BRCA2*

O silenciamento epigenético do *BRCA1* é descrito em 10-15% dos casos dos tumores serosos de alto grau, e apesar de estudos pré-clínicos sugerirem o mesmo impacto favorável desta alteração que as mutações germinativas (STEFANSSON et al. 2012), dois estudos clínicos incluindo o TCGA mostraram que pacientes com silenciamento epigenético do *BRCA1* apresentam um pior prognóstico que as pacientes não portadoras de mutações ou que aquelas portadoras de mutações germinativas (CHIANG et al. 2006; TCGA 2011; DONG et al. 2016). Os dados em pacientes com câncer de mama também sugerem que o silenciamento epigenético confere um pior prognóstico (GUO et al. 2015). Uma análise do perfil de expressão das vias da PI3K-Akt e do p53 corrobora a diferença entre o impacto das mutações germinativas e do silenciamento epigenético feita em pacientes com câncer de ovário. Este estudo mostrou três perfis diferentes, um para as pacientes com mutações germinativas, outro para pacientes com silenciamento epigenético e outro para pacientes sem nenhum tipo de alteração do *BRCA* (PRESS et al. 2008).

F) Expressão da proteína BRCA1 por imunistoquímica

Uma tentativa de encontrar um marcador que agregasse as informações de todas as alterações descritas, mutações germinativas, somáticas e silenciamento epigenético, seria avaliar um ponto potencialmente modificado pelas três alterações que é a expressão proteica de BRCA.

A avaliação da expressão da proteína BRCA1 por imunistoquímica foi feita em diversos trabalhos, a maioria deles classificou os tumores como negativo/perda de expressão ou positivo/intacto/expressão mantida a partir de um ponto de corte de 10% das células com marcação nuclear. Com este critério, o resultado negativo/perda de expressão mostrou uma boa sensibilidade para indicar a presença das mutações germinativas do *BRCA1*, com um valor preditivo negativo entre 93 e 100% em dois estudos (SKYTTE et al. 2011; GARG et al. 2013; MEISEL et al. 2014). GARG et al. (2013) também mostraram uma associação, embora com valor preditivo negativo não tão alto, com resultados de mutações somáticas e silenciamento epigenético do *BRCA1* (GARG et al. 2013).

A perda de expressão de BRCA1 se mostrou relacionada com um melhor prognóstico com uma sobrevida global mediana de 62x45 meses (THRALL et al. 2006; SWISHER et al. 2009; GAN et al. 2013; HJORTKJÆR et al. 2016), e uma maior sensibilidade ao tratamento com platina em monoterapia com uma taxa de resposta de 68,5x46,8% (CARSER et al. 2011). Uma análise retrospectiva de um dos estudos fase III de quimioterapia intraperitoneal mostrou que a perda de expressão de BRCA é capaz de prever um maior benefício da via de administração da platina intraperitoneal em relação à via venosa (LESNOCK et al. 2013).

1.5.2 Inibidores de PARP

A identificação das pacientes com deficiência da via da HR se faz mais importante a partir do momento em que há drogas alvo com ação seletiva neste grupo de pacientes.

A poli ADP ribose polimerase (PARP) é uma enzima parte do sistema de reparo por excisão de bases (BER) responsável pelo reparo de lesões de uma fita de DNA. Células com deficiência da via da HR tem reparo ineficaz das lesões de dupla fita de DNA. Quando um dos sistemas (HR ou BER) é afetado de forma isolada não ocorre a morte celular porém, se em uma célula que já apresenta deficiência de um desses sistemas o outro for bloqueado, é gerada uma instabilidade genética grande que pode levar a apoptose. Esse conceito é denominado de letalidade sintética. Os inibidores de PARP (PARPi) são drogas alvos para as quais as células com deficiência da HR apresentam alta sensibilidade. Há pelo menos quatro hipóteses para esta ação seletiva dos PARPi: (1) a inibição das PARP bloqueia a ação do BER o que leva a um acúmulo de lesões de dupla fita de DNA; nas células com deficiência da HR leva a morte celular; (2) os PARPi levam a um aprisionamento de PARP1 nos sítios de lesão de dupla fita o que impede o acesso de outras proteínas de reparo; (3) falha para iniciar a ativação da via da HR por um mecanismo dependente de PARP; e (4) a ativação da via da NHEJ induz o aparecimento de outros erros no DNA após o reparo (DE LORENZO et al. 2013; REINBOLT e HYS 2013).

O olaparibe é a droga sobre a qual existem mais relatos em literatura. Um estudo de fase II com 63 pacientes previamente tratadas com quimioterapia encontrou uma taxa de resposta de 41% em pacientes com mutação germinativa do *BRCA1* ou *BRCA2* e 24% naquelas sem mutação (GELMON et al. 2011). Um

segundo estudo de fase II comparando olaparibe com doxorubicina lipossomal em pacientes portadoras de mutações germinativas do *BRCA1* ou *BRCA2* com recidiva com intervalo livre de platina menor que 12 meses mostrou uma taxa de resposta de 31x18% que não foi estatisticamente significativa. Apesar de não mostrar superioridade em relação a um tratamento quimioterápico, este estudo mostrou atividade não desprezível neste cenário de doença politratada onde 66% das pacientes tinham recebido três ou mais tratamentos quimioterápicos prévios (KAYE et al. 2012; DOMCHEK et al 2016). Dois estudos de fase II randomizados no cenário de manutenção pós tratamento de quimioterapia em pacientes com doença platina sensível mostraram um ganho de sobrevida livre de progressão (LEDERMANN et al. 2012; OZA et al. 2015). LEDERMANN et al. (2014) mostraram o benefício na população não selecionada com sobrevida livre de progressão mediana de 8,4 versus 4,8 meses ($p < 0,0001$, HR 0,35). O benefício foi mais pronunciado no grupo de pacientes com mutações germinativas ou somáticas do *BRCA1* ou *BRCA2* com sobrevida livre de progressão mediana de 11,2 versus 4,3 meses ($p < 0,0001$, HR = 0,18) (LEDERMANN et al. 2014). Em uma análise *posthoc* não planejada excluindo as pacientes que sofreram *crossover* da análise, houve ganho de sobrevida global para as pacientes tratadas com olaparibe (MATULONIS et al. 2016). Baseado neste estudo o olaparibe foi aprovado para uso no cenário de doença platina sensível na Europa para pacientes com mutações germinativas ou somáticas do *BRCA1* ou *BRCA2*.

Curiosamente neste mesmo estudo a análise da população de pacientes sem mutação de *BRCA* mostrou um benefício dos inibidores de PARP, com uma sobrevida livre de progressão mediana de 7,4 versus 5,5 meses ($p=0,0075$, HR 0,54)

(LEDERMANN et al. 2012). Este achado levanta a hipótese de que haja um grupo de pacientes sem mutação de *BRCA* que apresenta sensibilidade aos inibidores de PARP por outro mecanismo. Esta informação vem de encontro ao conhecimento de que as alterações da via da recombinação homóloga estão presentes em aproximadamente 50% das pacientes com carcinoma de ovário (TCGA 2011).

Hoje uma das perguntas mais urgentes a ser respondida na pesquisa de pacientes com câncer de ovário é como identificar essas pacientes sem mutação de *BRCA* que tem deficiência da via da recombinação homóloga e se beneficiam do tratamento com inibidores de PARP.

1.5.3 “BRCAness”

A limitação de qualquer um dos métodos descritos acima na identificação das pacientes com o perfil de deficiência da via da HR é que primeiro a avaliação da expressão proteica não apresenta uma associação precisa das mutações germinativas e somáticas e alterações epigenéticas do *BRCA* a ponto de poder substituí-las. Segundo, a deficiência da via da HR pode ocorrer por mecanismos não relacionados diretamente ao *BRCA1* ou *BRCA2*, mas sim às outras proteínas relacionadas à via. Dessa forma alguns trabalhos utilizando metodologias distintas vêm tentando detectar um marcador de deficiência da via da HR que abrangeria todas as alterações relacionadas com esta via. As três principais estratégias são assinaturas genéticas, a avaliação da formação dos focos nucleares de expressão de proteínas finais da via da HR e o perfil de alteração do número de cópias genômicas.

As assinaturas genéticas avaliam o perfil de expressão gênica por meio da avaliação dos RNA mensageiros. Ao menos três relatos mostraram diferentes

assinaturas genéticas capazes de diferenciar um grupo de tumores *BRCA-like* dentro dos tumores esporádicos de ovário, mostrando também uma associação destes tumores com maior resposta a platina, melhor sobrevida global e, em linhagens celulares, maior resposta aos inibidores de PARP (JAZAERI et al. 2002; KONSTANTINOPOULOS et al. 2010; PRADHAN et al. 2010; KANG et al. 2012).

Uma alternativa para detecção dos tumores com deficiência da via da recombinação homóloga seria detectar alterações nos componentes finais da via da HR. GRAESER et al. (2010) avaliaram tumores de mama para determinar a presença de focos nucleares de RAD51 em células em proliferação, identificadas pela expressão de geminina. Os autores encontraram uma relação entre a perda de formação dos focos de RAD51 e características de perda da função da via da HR (GRAESER et al. 2010). DUAN et al. (2013) avaliaram, a formação de focos nucleares de FANCD2 nas células em proliferação de tumores de mama e encontraram uma associação entre a perda de formação desses núcleos e a deficiência da via da HR.

Uma marca dos defeitos da HR é a grande instabilidade genética com muitas alterações do número de cópias do DNA. Baseado neste fato alguns estudos mostraram a associação de padrões de alteração do número de cópias e perda de heterozigose com a deficiência da via da recombinação homóloga. Este perfil de alterações estruturais é conhecido como cicatriz genômica (WATKINS et al. 2014; LEDERMANN et al. 2016; LORD e ASHWORTH 2016).

Os estudos iniciais utilizaram Hibridação Genômica Comparativa baseada em arrays (*aCGH*), com a presença de deficiência da via da HR em tumores de mama (LIPS et al. 2013; SCHOUTEN et al. 2013). No estudo do TCGA de tumores de

ovário, as alterações do número de cópias genômicas se mostraram mais frequentes que as mutações em ponto, porém não houve diferença do perfil global de alteração do número de cópias entre tumores com mutação do *BRCA* e tumores sem a mutação (TCGA 2011). Apesar disto, outros dois estudos utilizando métodos distintos fizeram avaliações de subgrupos específicos de alterações do número de cópias e um deles encontrou uma associação entre alterações do *BRCA* e uma maior proporção de perdas em relação aos ganhos genômicos (KAMIENIAK et al. 2013).

O segundo estudo, em uma coorte de paciente com câncer de mama avaliou por SNP *array* os padrões de perda de heterozigose dos tumores e encontrou uma associação entre as alterações do *BRCA* e de outros genes relacionados a via da HR (como *RAD51C* e *PTEN*) (ABKEVICH et al. 2012). Os autores denominaram de score LOH (cnLOH+L) o número de perdas de heterozigose de tamanho intermediário maiores que 15 Mbp e menores que um cromossomo que (ABKEVICH et al. 2012). Usando o ponto de corte de 10 LOH o estudo foi capaz de ter uma sensibilidade de 90% para detectar as pacientes com mutação de *BRCA1* ou *BRCA2*. Recentemente, foi confirmado o papel do score cnLOH+L na identificação de um grupo de pacientes com câncer de mama com maior taxa de resposta à quimioterapia baseada em cisplatina (TELLI et al. 2015).

Seguindo o mesmo conceito para identificar padrões específicos de alterações do número de cópias foram desenvolvidos outros scores. O Score de desequilíbrio alélico telomérico (telomeric *allelic imbalance score* - *TAI*) avalia a quantidade de regiões de desequilíbrio alélico, seja por perda de heterozigose sem alteração de número de cópias (cnLOH), seja por deleções, seja por ganhos, que se estendem da região da quebra da dupla fita de DNA até o telômero. Quanto maior o número de

regiões subteloméricas de desequilíbrio alélico desse tipo, maior a sensibilidade ao tratamento com platina (BIRKBAK et al. 2012).

Também em pacientes com câncer de mama foi desenvolvido um terceiro método chamado de escore de Transição de Larga Escala (*Large Scale Transition – LST*) baseado no número de pontos de quebra de DNA entre segmentos de no mínimo 10Mbp, o qual se mostrou associado à presença de mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* (POPOVA et al. 2012).

Um quarto escore utiliza uma combinação dos 3 escores anteriores (cnLOH+L, TAI e LST) mostrando que o escore combinado permite uma sensibilidade maior para detecção da deficiência da via da recombinação homóloga (TIMMS et al. 2014; MARQUARD et al. 2015).

Devido à alta prevalência e heterogeneidade de alterações da via da recombinação homóloga em pacientes com câncer de ovário e o potencial terapêutico a ser explorado em função dessas alterações se faz urgente a identificação e a padronização de um marcador capaz de identificar os tumores com deficiência dessa via.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO PRIMÁRIO

Caracterizar uma coorte de pacientes com carcinoma de ovário quanto à deficiência da via da recombinação homóloga utilizando escores calculados a partir das alterações do número de cópias genômicas e de perdas de heterozigose.

2.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

- 1 Avaliar a associação entre os escores de deficiência da via de recombinação homóloga e a resposta ao tratamento com quimioterapia baseada em platina em pacientes com recidiva de doença platina resistentes;
- 2 Avaliar a associação entre as características clínicas e patológicas e os escores de deficiência de via da recombinação homóloga;
- 3 Avaliar a associação entre as características clínicas e patológicas e a resposta ao tratamento com quimioterapia baseada em platina em pacientes com recidiva de doença platina resistentes.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 PACIENTES

Foram avaliados retrospectivamente os dados de 31 pacientes com diagnóstico de carcinoma de ovário com recidiva platina resistente que foram re-expostas ao tratamento com quimioterapia baseada em platina. Todas as pacientes foram tratadas no A.C.Camargo Cancer Center no período de 2005 a 2014. As pacientes foram identificadas no banco de dados eletrônico do A.C.Camargo Cancer Center por meio de uma busca pelo código internacional da doença (CID) C56 e diagnóstico histológico de carcinoma de ovário.

Os dados clínicos foram coletados dos registros em prontuário médico eletrônico, empregando ficha de coleta de dados elaborada especificamente para este estudo (Anexo 2). Dentre essas pacientes foram identificadas aquelas que apresentaram recidiva platina resistente e que receberam tratamento com quimioterapia baseada em platina. Recidiva de doença platina resistente foi definida com uma recidiva que ocorreu em menos de 6 meses após o último tratamento com quimioterapia baseada em platina. Em uma mesma paciente as recidivas que ocorreram após esta primeira recidiva platina resistente foram também consideradas como recidivas platina resistentes.

3.1.1 Critérios de Inclusão

- Pacientes com diagnóstico de carcinoma de ovário tratadas no A.C.Camargo Cancer Center, São Paulo, SP no período de janeiro de 2005 a dezembro de 2014 com recidiva platina resistente e tratadas com quimioterapia baseada em platina.

3.1.2 Critérios de Exclusão

- Pacientes com diagnóstico de carcinoma mucinoso de ovário.
- Pacientes sem dados registrados em prontuário sobre a avaliação da resposta ao tratamento de reexposição à quimioterapia baseada em platina no cenário da recidiva platina resistente.

3.2 DADOS CLÍNICOS E DESFECHOS

Os seguintes dados clínicos foram coletados referentes ao momento do tratamento de reexposição à platina no cenário platina resistente: idade da paciente, histologia do tumor, número de tratamentos que antecederam o tratamento de reexposição à platina a ser avaliado, data da última aplicação de quimioterapia com platina antecedendo o tratamento de reexposição à platina, data de início do tratamento de reexposição à platina, esquema de quimioterapia de reexposição à platina utilizado. Foi considerada como história familiar positiva a presença de história familiar de câncer de mama ou ovário independente do grau de parentesco ou a presença de história pessoal de câncer de mama da própria paciente. Foi

considerada paciente com resistência primária à platina quando a primeira recidiva após o tratamento inicial ocorreu com intervalo livre de platina menor que 6 meses.

A avaliação de resposta para todas as pacientes foi considerada de acordo com a descrição presente em prontuário realizada pelo médico assistente da paciente. Na rotina clínica essa avaliação se baseia nos aspectos clínicos, de marcadores tumorais e exames de imagem. Para as pacientes que foram submetidas à avaliação molecular, a avaliação de resposta foi revisada utilizando os dados do marcador tumoral CA 125 e os laudos de exames de imagem. Os critérios do GCIG (“Gynecologic Cancer InterGroup”) foram utilizados para avaliar a resposta levando em conta os critérios de RECIST 1.1 e a medida do CA125 para classificar a resposta em resposta completa (RC), resposta parcial (RP), doença estável (DE) ou progressão de doença (PD) (RUSTIN et al. 2010). De acordo com esses critérios a resposta pelo CA125 ao tratamento é definida como uma redução de pelo menos 50% em relação ao valor que precedeu o tratamento estando o valor inicial ao menos 50% acima da referência da normalidade. Para as pacientes que possuíam avaliação de resposta, porém sem atender a todas as necessidades para categorizá-la de acordo com os critérios descritos, a resposta foi avaliada levando-se em conta a descrição em prontuário de melhora ou piora clínica bem como de outros exames de imagem como PET-CT. A resposta foi categorizada em “resposta” nos casos de resposta parcial e resposta completa ou “não resposta” nos casos de doença ou progressão de doença.

A sobrevida global do tratamento de reposição à platina (SG plat) foi definida a partir do intervalo de tempo entre a data do início do tratamento de reexposição à platina e a data do último acompanhamento e considerando o evento óbito por qualquer causa. A sobrevida global do diagnóstico (SG diag) foi definida a partir do

intervalo de tempo entre a data do diagnóstico inicial e a data do último acompanhamento e considerando o evento óbito por qualquer causa.

3.3 AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES GENÔMICAS ESTRUTURAIS

3.3.1 Material

Para a pesquisa das alterações do número de cópias genômicas e perda de heterozigose foram utilizadas amostras de neoplasia de ovário fixadas em formalina e em blocos de parafina de 14 pacientes.

As amostras prioritariamente utilizadas foram aquelas com material coletado no momento do diagnóstico; na ausência destas foi utilizado material coletado em outros momentos do tratamento.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do A.C. Camargo Cancer Center em 03 de setembro de 2014, pelo parecer número 776.590, sob o número CAAE: 33710314.0.0000.5432 (Anexo 1). Os pacientes incluídos neste estudo assinaram termo de Consentimento Livre e Esclarecido autorizando o uso das amostras para pesquisa.

3.3.2 Extração de DNA

Para extração do DNA das amostras fixadas e em blocos de parafina foi utilizado o kit RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit (Ambion – Life Technologies). O protocolo envolve os passos descritos a seguir. **Desparafinização:** cinco secções de 10 µm de cada bloco de parafina contendo a amostra do tumor são

acondicionados em um tubo de microcentrífuga de 1,5mL. Adiciona-se 1mL de xileno a 100% seguido por incubação por 3 minutos a 50°C. Em seguida, centrifuga-se por 2 minutos a 14000 rpm. Descarta-se o xileno e procede-se a lavagem do material duas vezes com 1mL de etanol a 100%. As amostras são secas a vácuo para remover o etanol residual. **Digestão com proteases:** Adiciona-se 100µL de *digestion buffer* e de 4µL de protease. Incubação por 16h a 50°C. **Isolamento do ácido nucleico:** Adição de 395µL da solução contendo *isolation additive* e 275µL de etanol. As amostras são então filtradas (*filter cartridge*). Em seguida, as amostras são passadas por processos de lavagem utilizando 700µL da solução 1, seguida de 500µL da solução 2 e 3. **Digestão por nuclease e purificação final:** Adicionam-se 10µL de RNase A e 50µL de água livre de nuclease a cada cartucho de filtro seguido por incubação a 37°C durante 30 minutos. Procede-se a lavagem com 700µL da solução 1 seguida pelo uso de 500µL de solução 2 e 3. Adiciona-se a solução de eluição ou água livre de nuclease pré aquecida a 95°C por 1 minuto. Centrifuga-se por 1 minuto a 14 000 rpm.

3.3.3 Análise do perfil de alteração genômicas e mutações utilizando a plataforma Oncoscan(Affymetrix)

A avaliação das variações do número de cópias genômicas (perdas e ganhos) e cnLOH (do inglês, copy neutral Loss of heterozygosity) e de 74 mutações de 9 genes foi realizada utilizando-se a plataforma Affymetrix® OncoScan Assay. Esta plataforma utiliza a tecnologia de *Molecular Inversion Probe* (MIP) que foi inicialmente desenvolvida para a genotipagem de polimorfismos de um único nucleotídeo (SNP), mas que posteriormente foi usada para identificar outros tipos de

variações genéticas incluindo inserções e deleções focais, alterações do número de cópias, cnLOH, mosaicismos e, mais recentemente, para detecção de mutações.

Os resultados obtidos com o uso dessa plataforma são de qualidade muito boa mesmo com DNA altamente degradado, como aquele derivado de blocos de parafina de várias idades com menos de 100 ng de DNA no material inicial. O método de MIP consiste na utilização de uma sonda de oligonucleotídeo com sequências de reconhecimento em cada extremidade da sonda que é hibridizada com uma sequência genômica alvo de maneira a formar uma estrutura circular. Desta forma, as extremidades da sonda ficam muito próximas distantes em uma única base nitrogenada. Esse espaço é posteriormente preenchido pela ligação da base complementar ao DNA genômico de forma que o nucleotídeo ligado faz a diferenciação do alelo presente. As sondas com sua sequência complementar hibridizada são então liberadas do DNA genômico e aquelas que tiveram o espaço vazio entre as extremidades preenchido de forma adequada formando um círculo completo, são amplificadas utilizando-se a PCR com um iniciador universal. Cada região amplificada contém uma sequência de identificação única que é complementar a uma sequência do “universal tag array”. Os amplicons são marcados com fluorescência e as sequências identificadas são liberadas da sequência genômica utilizando tratamento com endonuclease. As sequências são então reconhecidas após sua hibridização no chip de sequências complementares (WANG et al. 2009).

As sondas de MIP são utilizadas para avaliar 220.000 SNPs em todo o genoma com resolução de 50 a 100 Kbp em 900 genes relacionados ao câncer e em torno de 300 Kbp nas outras regiões genômicas.

A análise dos dados obtidos nessa plataforma usa como referência de normalidade do número de cópias um banco de dados universal construído a partir dos dados de 400 amostras de tecido normal. A porcentagem de células com alterações na amostra é calculada pelo algoritmo TUSCAN, uma adaptação do algoritmo ASCAT (VAN LOO et al. 2010).

Além desta plataforma permitir a avaliação de alterações estruturais, é também possível detectar 74 mutações em 9 genes relacionados à carcinogênese (*BRAF, KRAS, EGFR, IDH1, IDH2, PTEN, PIK3CA, NRAS, TP53*).

No presente estudo, os procedimentos foram realizados de acordo com as recomendações do fabricante. Sinteticamente: as mostras de DNA são diluídas a 16ng/mL, e o DNA quantificado utilizando-se o PicoGreen dsDNA Assay Kit (Molecular Probes/Invitrogen, Carlsbad, CA, USA, P7589). A primeira etapa consiste na **incubação** durante toda a noite. 4,7 µl da amostra de DNA (total de 75 ng), 0,75 µl de solução tampão A, 1,1 µl de pool de 53 K de sondas (200amol/µl/sonda) e 0,045 µl da Enzima A são misturadas na placa com 384 pequenos recipientes em gelo. A reação é incubada a 20°C por 4 minutos, 95°C por 5 minutos e então 58°C por toda a noite. No segundo dia, 13µl de solução tampão A são acrescentados a cada recipiente com 1,25 µl de Gapfill Enzime Mix. Então, 9 µl dessa solução é colocada em 1 a cada 2 recipientes em uma outra placa com 96 pequenos recipientes. As sondas de MIP são circularizadas com 4 µl de dinucleotídeo (dATP com dTTP, dCTP com dGTP) e misturadas a 58°C por 10 minutos. As sondas não circularizadas e o DNA genômico são eliminados com adição de 4 µl de solução com exonuclease e incubação a 37°C por 15 minutos, seguido por aquecimento para eliminar as enzimas. As sondas circularizadas são linearizadas com a adição da

solução Cleavage Enzyme a 37°C por 15 minutos, e então são submetidas a amplificação com um iniciador universal por 18 ciclos a 95°C por 20 segundos, 64°C por 40 segundos e 72°C por 10 segundos. Para a reação de marcação, o produto da amplificação é novamente amplificado com as sondas marcadas por 10 ciclos e então submetido a clivagem pela solução Digestive Enzyme a 37°C por 2 horas. Para a hibridação, os produtos da MIP clivados são misturados em um coquetel de hibridação, desnaturados e hibridados no chip de 70 K Universal Tag Arrays a 39°C por 16 horas (dois chips para cada amostra). A reação de hibridação ocorre durante a noite e então os chips são lavados no *GeneChip® Fluidics Station FS450* e marcados pelo SAPE a 5 ng/ml (Invitrogen) para leitura (WANG et al. 2007).

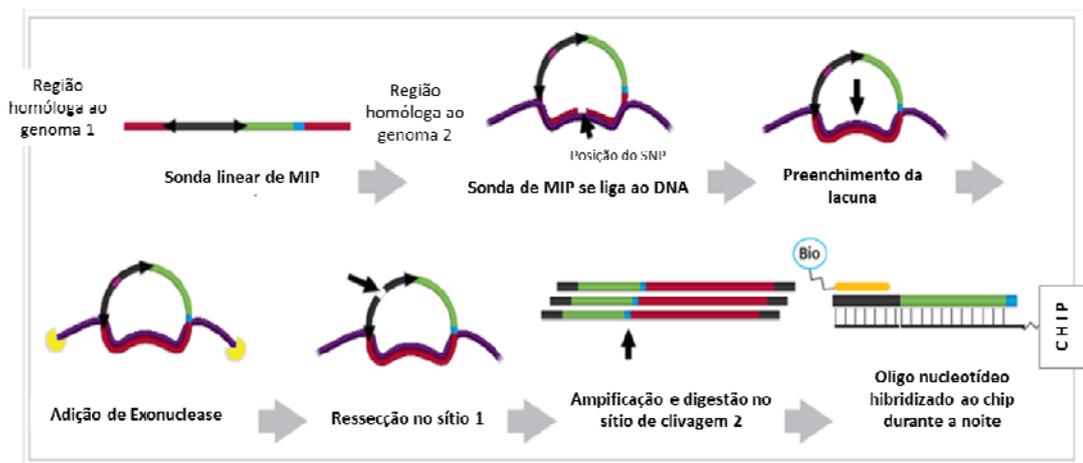
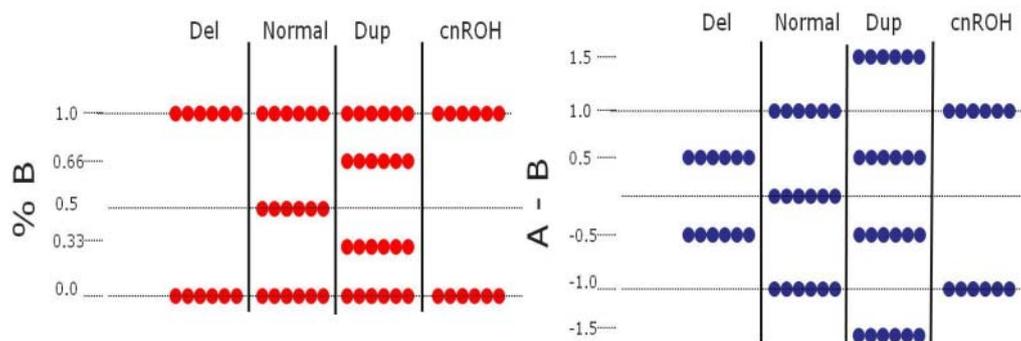


Figura 2 – Representação esquemática do método “Molecular Inversion Probe” (MIP). SNP = polimorfismo de único nucleotídeo.

A leitura de cada chip gera um arquivo com dados da intensidade dos sinais das sondas do tipo CEL que foi analisado utilizando-se o programa Affymetrix® “Chromosome Analysis Suite (ChAS) 3.1”. A intensidade de sinal das sondas de SNPs fornece os dados brutos de log₂ ratio e da frequência do alelo B (BAF do

inglês “B allele frequency”). A partir destes dados são calculados o número de cópias de cada segmento e avaliada a frequência de cada alelo conforme ilustra a figura abaixo (Figura 3). Consideramos para fins de descrição dos achados neste trabalho como alterações distintas as regiões de perda de heterozigose (LOH) sem perda de número de cópias (*copy neutral LOH – cnLOH*) daquelas regiões em que há deleção e por conta disso presença de um único alelo (delLOH). Para a contagem de um dos escores, o escore *cnLOH+L* foram incluídas como regiões a serem contadas tanto as áreas de *cnLOH* quanto as áreas de delLOH. Foram utilizados como filtros para detecção das alterações dos números de cópias e detecção de heterozigose uma extensão mínima de 50 marcadores ou 400kbp.



Fonte: Adaptado de CONLIN et al. (2010).

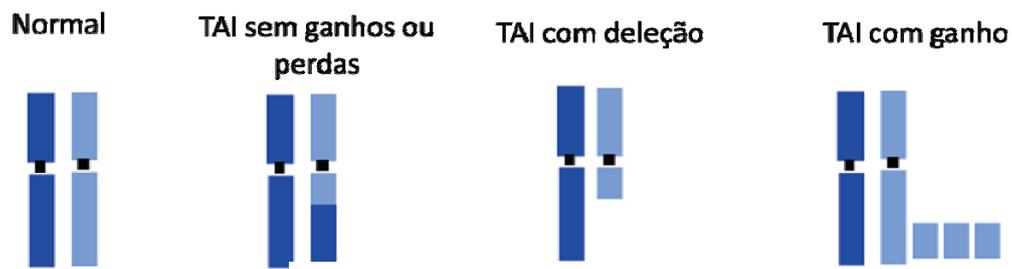
Figura 3 – Padrões de frequência de alelo B (%B) e de diferença entre os alelos(A-B) que permite a avaliação das alterações estruturais do genoma. Del = deleção, Dup = duplicação, *cnROH* = *cnLOH* = perda de heterozigose com número de cópias inalterado.

As alterações dos segmentos identificadas pelo programa foram analisadas individualmente por dois examinadores (AABAC e LCM) para exclusão de alterações identificadas pelo programa que fossem atribuíveis a ruído.

3.3.4 Cálculo dos escores de deficiência da via da recombinação homóloga

Foram avaliados os seguintes escores relacionados à deficiência da via da recombinação homóloga: escore de *Telomeric Allelic Imbalance* (TAI) (BIRKBAK et al. 2012), escore de perda de heterozigose (cnLOH+L) (ABKEVICH et al. 2012) e escore de *Large Scale Transition* (LST) (POPOVA et al. 2012). Os escores TAI e LST também foram avaliados na sua forma modificada para integrarem um quarto escore (HRD) que sintetiza a informação dos outros três escores (TAI modificado +cnLOH+L + LST modificado) (TIMMS et al. 2014). Esses escores são definidos da seguinte forma:

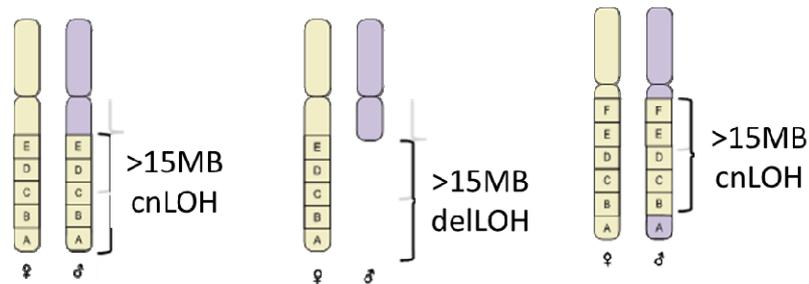
- TAI: quantidade de segmentos com desequilíbrio dos alelos que se estende da região subtelomérica por uma extensão mínima de 200 sondas (aproximadamente 1,8 Mbp) e se restringe a não cruzar o centrômero. Desta forma cada cromossomo pode contribuir com até 2 pontos no escore. É considerado no escore a amplitude mínima de um número médio de cópias do segmento de 2,5 para ganhos e 1,5 para perdas (BIRKBAK et al. 2012). Não há ponto de corte descrito em literatura para definir o escore como positivo, sendo portanto considerado como uma variável contínua. (Figura 4).



Fonte: Adaptado de BIRKBAK et al. (2012).

Figura 4 - Ilustração de alterações consideradas no escore TAI -*telomeric allelic imbalance*.

- TAI modificado (TAIm): difere em relação ao TAI apenas na extensão mínima das alterações. O mínimo para ser considerado alterado neste modelo modificado é uma extensão de 11 Mbp como proposto por TIMMS et al. (2014).
- cnLOH+L: quantidade de regiões de cnLOH maiores que 15 Mbp porém menores que um cromossomo inteiro. O cromossomo 17 não é considerado na contagem uma vez que perda de heterozigose neste cromossomo é quase universal nos carcinomas serosos de ovário. Escores maiores que 10 foram considerados como positivos para a deficiência de recombinação homóloga (ABKEVICH et al. 2012) (Figura 5).



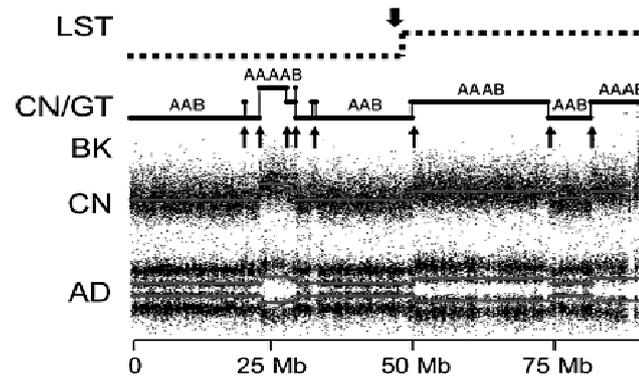
Fonte: Extraído de WATKINS et al. (2014)

Figura 5 – Ilustração de alterações consideradas no escore cnLOH+L. cnLOH = *copy neutral Loss of heterozygosity* (regiões de homozigose sem alterações no numero de cópias). delLOH = *Loss of heterozygosity with deletions* (regiões de homozigose com área de deleção)

- LST: número de pontos de quebra do cromossomo entre regiões maiores que 10 Mbp após submeter os segmentos com alterações com extensão menor que 3 Mbp a “smoothing”, e não considerando os pontos de quebra que coincidem com o centrômero. O braço curto e o braço longo de cada cromossomo são analisados de formas independentes (Figura 6). O ponto de corte para definição de deficiência da via da recombinação homóloga depende da ploidia estimada do tumor. Para tumores considerados “quase diplóides” se considera deficiência da via da recombinação homóloga caso haja mais de 15 LST, para tumores “quase tetraplóides” o ponto de corte é de 20 LST (POPOVA et al. 2012).

Para se estimar a ploidia do tumor de forma aproximada foi utilizado o método descrito e validado por POPOVA et al. (2012): estima-se o número de cromossomos do genoma da amostra pela soma do número de cópias das regiões pericentroméricas. Genomas com mais de 60 cromossomos são considerados “quase

tetraplóides” e aqueles com menos de 60 cromossomos são considerados “quase diplóides” (POPOVA et al. 2012, 2013b; PÉCUCHE et al. 2013).



Fonte: Extraído de POPOVA et al. (2013b).

Figura 6 – Ilustração de região considerada como LST, após “smoothing” dos segmentos menores que 3 Mbp. LST = “large scale transition”, CN = número de cópias, BK = pontos de quebra, AD = diferença dos alelos. Seta mais grossa indica local de ponto de quebra entre duas grandes regiões. Setas menores indicam todos os pontos de quebra cromossômica.

- LST modificado (LSTm): difere em relação ao LST original por não definir deficiência da via da recombinação homóloga por um ponto de corte específico de acordo com a ploidia mas por gerar um escore modificado ajustado por ela da seguinte forma: $LSTm = LST - kP$, onde P é a ploidia e k é a constante 15,5 determinada no estudo de TIMMS et al. (2014) como o valor otimizado para distinção entre os grupos de recombinação homóloga deficiente e proficiente.
- HRD: média aritmética da soma dos 3 escores TAI_m, cnLOH+L e LST_m como proposto por TIMMS et al. (2014).

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi utilizada análise estatística descritiva para a caracterização das amostras com determinação de frequências, médias, medianas e medidas de dispersão central.

Para a análise de interação entre variáveis categóricas foi usado o teste de exato de Fisher. Para a comparação entre as medianas de variáveis contínuas, como os escores, de acordo com as categorias das variáveis categóricas, foi utilizado o teste de Mann-Whitney.

Para avaliar a concordância entre a classificação do status da via da recombinação homóloga pelos escores foi utilizado o coeficiente de concordância Kappa para os escores com ponto de corte previamente definido em literatura (cnLOH+L e LST) e o coeficiente de Spearman para avaliar a correlação entre os 3 escores originais (TAI, cnLOH+L e LST) como variáveis contínuas.

Curvas de Kaplan-Meier foram geradas para análise de sobrevida e o impacto das diversas variáveis avaliadas pelo teste de log-rank.

Foi empregada a análise multivariada para a predição do impacto combinado de variáveis independentes na taxa de resposta ao tratamento com quimioterapia baseada em platina usando-se regressão logística. A análise multivariada foi também utilizada para a predição do impacto combinado de variáveis independentes na sobrevida usando-se o modelo de regressão de Cox com riscos proporcionais.

Foram considerados valores estatisticamente significativos aqueles com de $p < 0,05$. O pacote estatístico das análises realizadas neste estudo foi SPSS 21.0 para Machintosh.

4 RESULTADOS

No período de 2005 a 2014 foram diagnosticadas e tratadas no A.C.Camargo Cancer Center 405 pacientes com carcinoma de ovário. Trezentos e quarenta e sete pacientes tinham dados clínicos disponíveis. Dentre elas, 121 pacientes apresentaram recidiva de doença e foram classificadas como platina resistentes. No grupo de pacientes com recidiva platina resistentes, 35 pacientes foram reexpostas ao tratamento com quimioterapia baseada em platina, das quais quatro não possuíam dados sobre a resposta ao tratamento. No presente estudo, foram incluídas 31 pacientes deste grupo. As 31 pacientes tiveram seus dados clínicos analisados. Vinte e sete amostras de DNA foram extraídas de material do tumor de 20 pacientes. Os casos foram escolhidos para extração de DNA baseado na quantidade de material biológico disponível, sendo selecionados os casos com maior quantidade de tumor presente nos blocos de parafina de acordo com avaliação por microscopia óptica das lâminas com coloração de hematoxilina e eosina. Das 27 amostras, nove apresentavam quantidade de DNA insuficiente para prosseguir o ensaio. Dezoito amostras de DNA foram submetidas ao ensaio com a plataforma ONCOSCAN. Destas, três foram excluídas da análise por não passarem nos critérios de controle de qualidade dos dados. Permaneceram no final da análise 15 amostras de 14 pacientes distintos (Figura 7).

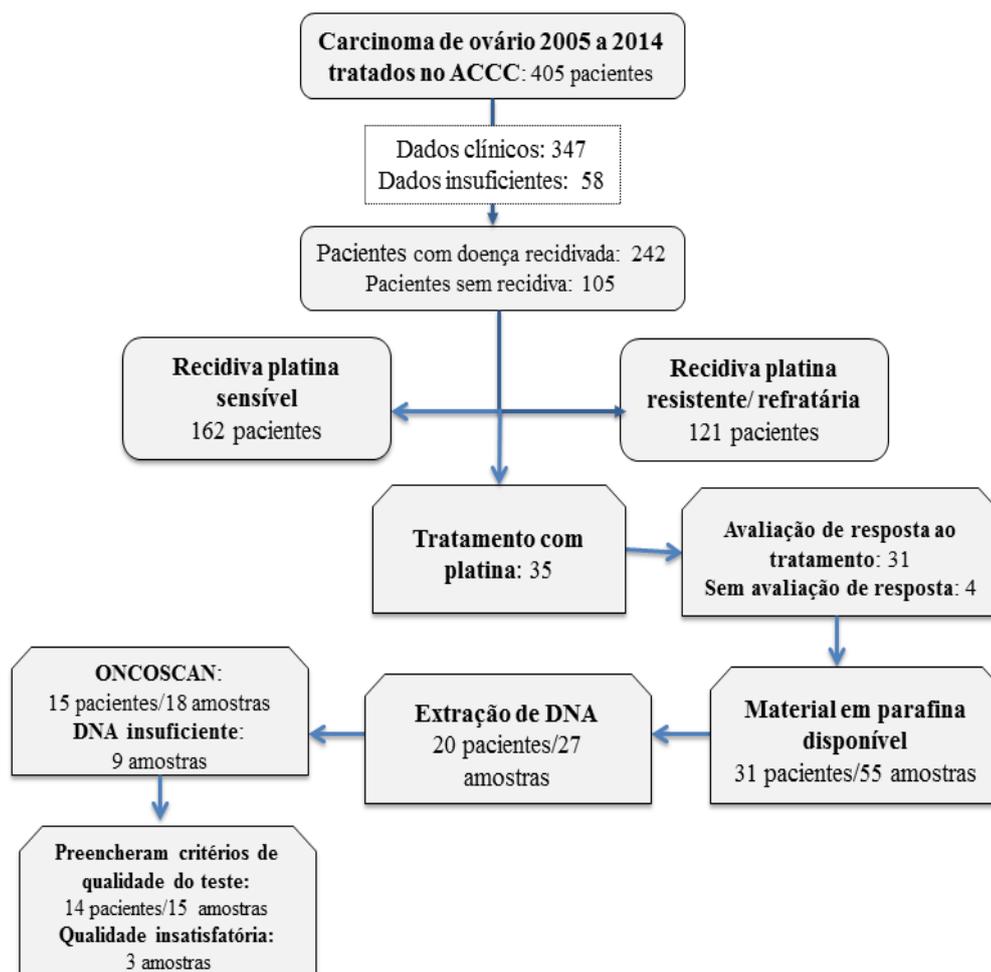


Figura 7 – Diagrama demonstrando a inclusão das pacientes no estudo.

4.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

As características clínicas das pacientes estão apresentadas nas Tabelas 3, 4 e 5. A idade mediana das pacientes foi de 56,6 anos (P25-75 = 52,1 – 67,5 anos), sendo 10 pacientes (32,4%) acima dos 65 anos. A histologia predominante foi carcinoma seroso de alto grau encontrada em 21 pacientes (67,0%). Dentre as outras histologias, uma paciente apresentava um tumor misto com componente de carcinoma seroso de alto grau e carcinoma de células claras, e uma paciente apresentava carcinoma de

células claras. Nove pacientes tinham história familiar de câncer de mama ou ovário sendo que duas pacientes apresentavam histórico pessoal de câncer de mama. Essas pacientes não foram submetidas a pesquisa de mutação germinativa de *BRCA1* ou *BRCA2* em nenhum momento da sua história.

A maioria das pacientes apresentava resistência primária à platina, sendo que todas as pacientes receberam ao menos duas linhas de tratamento prévias antes da reexposição à platina. O intervalo livre de platina mediano foi de 7,0 meses (P25-75 = 4,8-15,4 meses), sendo que 9 pacientes (29,0%) apresentaram intervalo livre de platina maior que 12 meses.

O esquema de reexposição à platina mais utilizado entre as pacientes selecionadas foi a combinação de carboplatina e paclitaxel, sendo que apenas uma paciente recebeu platina em monoterapia.

Tabela 3 - Características clínicas das 31 pacientes com carcinoma de ovário selecionadas para este estudo.

Características		Frequência N (%)
Total de pacientes		31 (100)
Idade	< 65 anos	21 (67,0)
	> 65 anos	10 (32,4)
Tipo histológico	Seroso de alto grau	21 (67,0)
	Endometrióide	1 (3,2)
	Células Claras	1 (3,2)
	Carcinoma indiferenciado	3 (9,7)
	Carcinossarcoma	1 (3,2)
	Mistos	1 (3,2)
	História familiar câncer de mama ou ovário*	Não
	Sim	9 (29,0)
Linhas de tratamento prévias	2	11 (35,5)
	3	6 (19,4)
	4	5 (16,1)
	5	6 (19,4)
	6	2 (6,5)
	8	1 (3,2)
	Intervalo livre de platina	< 12 meses
> 12 meses		9 (29,0)
Resistência primária à platina	Não	12 (38,7)
	Sim	19 (61,3)
Esquema de reexposição a platina	Platina +taxano	15 (48,4)
	Platina +gencitabina	13 (41,9)
	Platina + DLP	1 (3,2)
	Platina + ifosfamida	1 (3,2)
	Monoterapia	1 (3,2)

* Considerada positiva na presença de história de câncer de mama ou ovário na família, independente do grau de parentesco, ou se a paciente apresentasse história pessoal de câncer de mama.

Tabela 4 – Características clínicas individuais das 31 pacientes com carcinomas de ovário incluídas neste estudo.

Paciente	Idade (anos)	Histologia	História familiar	Linhas de tratamento prévias	Intervalo Livre de Platina (meses)	Esquema de reexposição à platina
1*	70,6	HGSC	Negativa	3	11,1	Cb + gencitabina + bevacizumabe
2*	62,1	HGCS	Negativa	5	10,1	Cb + paclitaxel semanais
3*	67,6	UC	Positiva	2	4,5	Cb + paclitaxel
4*	66,1	UC	Positiva	2	3,9	Cb + gencitabina
5	64,0	HGSC	Negativa	3	4,7	Cb + paclitaxel semanais
6	67,5	CCC	Positiva	2	7,0	CDDP + gencitabina
7*	68,3	HGSC	Negativa	4	5,9	CDDP + gencitabina
8	56,1	Misto	Negativa	2	5,5	CDDP + gencitabina
9*	43,0	HGSC	Negativa	5	3,4	CDDP + gencitabina
10*	56,5	HGSC	Negativa	4	9,7	CDDP + gencitabina
11	67,1	HGSC	Negativa	2	2,3	CDDP + gencitabina
12	56,7	HGSC	Negativa	4	10,3	Cb + paclitaxel semanais
13	54,5	HGSC	Positiva	5	21,6	Cb + paclitaxel semanais
14	67,9	Carcinossarcoma	Negativa	2	1,3	CDDP + Ifosfamida
15*	56,3	HGSC	Positiva	5	48,0	Cb + paclitaxel + bevacizumabe
16*	56,5	Endometrióide	Negativa	3	0,4	Cb monoterapia
17	64,3	HGSC	Negativa	2	5,1	Cb + paclitaxel
18	73,3	UC	Negativa	8	35,1	Cb + paclitaxel

Cont/ Tabela 4

Paciente	Idade (anos)	Histologia	História familiar	Linhas de tratamento prévias	Intervalo Livre de Platina(meses)	Esquema de reexposição à platina
19*	46,9	HGSC	Negativa	2	3,6	Cb + paclitaxel
20*	53,5	HGSC	Positiva	3	19,3	Cb + gencitabina
21*	49,5	HGSC	Negativa	6	6,8	CDDP + paclitaxel
22	51,7	HGSC	Negativa	5	16,5	Cb + gencitabina
23	51,5	HGSC	Positiva	5	15,4	CDDP + gencitabina
24	52,2	HGSC	Negativa	4	9,2	Cb + paclitaxel semanais
25*	68,0	HGSC	Positiva	4	8,5	Cb + paclitaxel
26	62,7	HGSC	Negativa	2	5,5	Cb + DLP
27*	53,8	HGSC	Negativa	2	5,9	CDDP + gencitabina
28*	46,7	HGSC	Positiva	2	13,5	Cb + gencitabina
29*	54,1	HGSC	Negativa	6	27,6	Cb + paclitaxel
30*	51,7	HGSC	Negativa	3	6,2	Cb + docetaxel
31	71,1	HGSC	Positiva	3	17,6	Cb + paclitaxel

HGSC = carcinoma seroso de alto grau; US = carcinoma indiferenciado; CCC = carcinoma de células claras ; Cb = carboplatina; CDDP = cisplatina; DLP = doxorubicina lipossomal

* Pacientes para os quais a amostra do tumor foi submetida ao ensaio com ONCOSCAN

Tabela 5 – História familiar detalhada das pacientes com história familiar positiva para câncer de mama ou ovário ou história pessoal de câncer de mama

Paciente	História pessoal de câncer de mama	História familiar detalhada de câncer (idade do diagnóstico)
3*	Não	Irmã ovário (ni), avó materna ovário (ni)
4*	Não	Tia** ovário (ni), prima** pâncreas (ni)
13	Não	2 tias paternas mama (<50 anos)
6	Sim	Tia materna mama (ni)
15*	Não	Mãe mama (65 anos), irmã mama (41 anos), tia materna mama (68 anos), tia materna pâncreas (54 anos)
20*	Não	Prima paterna mama (ni)
23	Sim	Tia materna mama (40 anos)
25*	Não	Avó paterna mama (ni)
28*	Não	Tia** mama
31	Não	Irmã mama (62 anos), pai próstata (ni)

* Pacientes para os quais a amostra do tumor foi submetida ao ensaio com ONCOSCAN

** Sem descrição se lado paterno ou materno da família

ni = Não informado

4.2 CARACTERÍSTICAS DAS AMOSTRAS TESTADAS

Entre as 31 pacientes selecionadas para este estudo, foi possível obter DNA de 28 amostras pertencentes a 20 pacientes. Destas, 18 amostras foram submetidas a análise pela plataforma OncoScan (Affymetrix). Três amostras apresentaram qualidade insuficiente para dar prosseguimento à análise. Foram obtidos resultados de qualidade em 15 amostras de 14 pacientes. Entre as pacientes com análise molecular completa, 11 tiveram o tumor primário analisado e 4 tiveram o tumor coletado no momento da recidiva platina resistente (Tabela 1 Anexo 4).

4.3 ALTERAÇÕES GENÔMICAS

A análise das alterações genômicas e o padrão de mutações realizado pela plataforma OncoScan (Affymetrix) foi realizado em 15 amostras de 14 pacientes. Foi observado um grande número de alterações genômicas em todos os casos analisados e envolvendo todos os cromossomos.

As figuras 8 e 9 ilustram as alterações genômicas globais encontrados nas 15 amostras. Todos os casos analisados mostraram cnLOH ou delLOH no cromossomo 17. O braço longo do cromossomo 22 apresentou perdas ou ganhos na maioria dos casos (Figura 10). Além destes, 13q apresentou cnLOH ou delLOH em a sua maior extensão em 12 dos 14 casos.

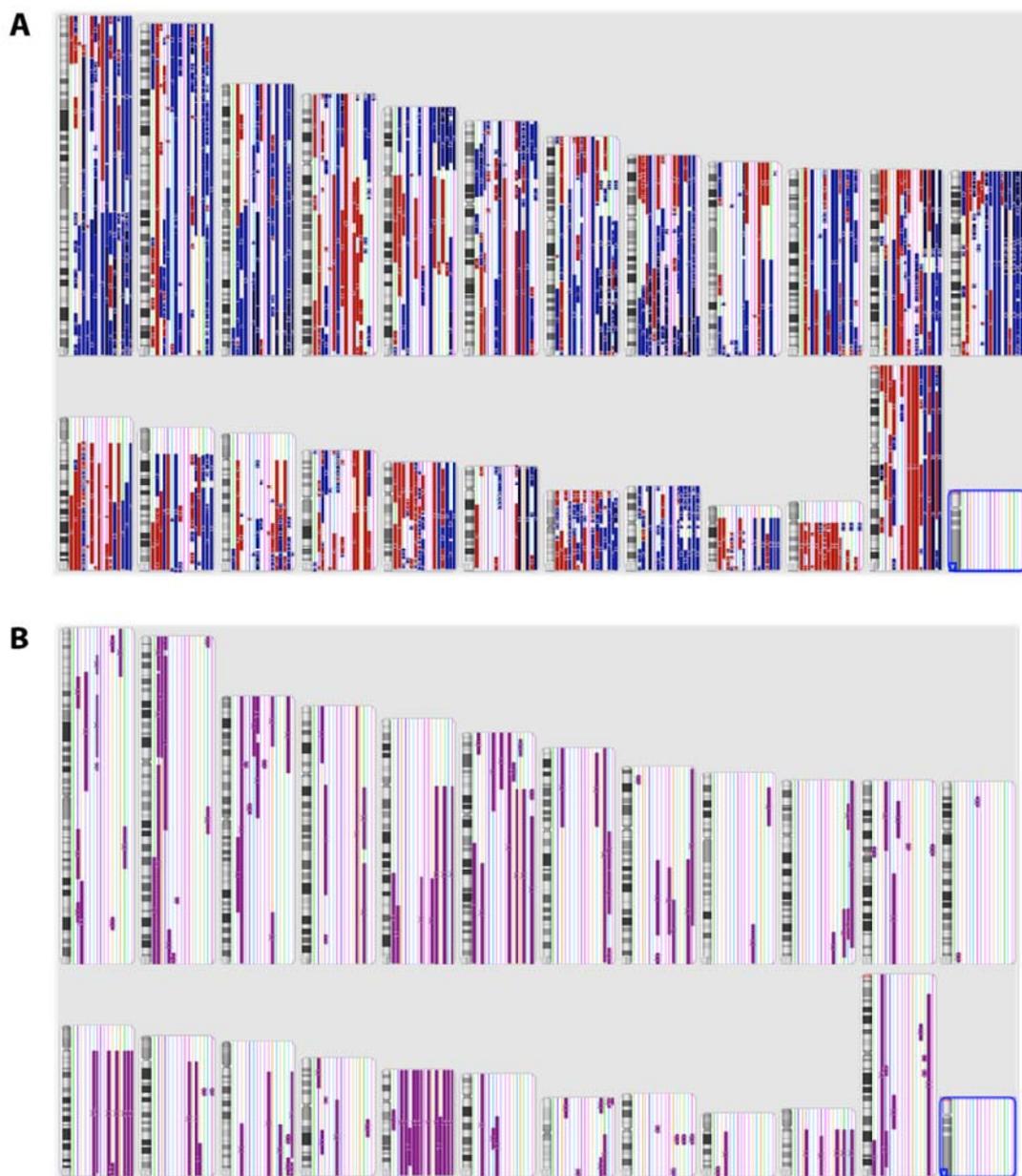


Figura 8 - Perfil de alterações genômicas detectados em 15 amostras de 14 pacientes com câncer de ovário. **A.** Ganhos (azul) e perdas (vermelho) podem ser observadas envolvendo todos os cromossomos humanos. Nota-se que o cromossomo 18 foi o menos frequentemente envolvido. **B.** cnLOH e delLOH (roxo) estão representadas ao longo dos cromossomos humanos. Nota-se a alta frequência de cnLOH no cromossomo 17. Foi utilizado o software Chromosome Analysis Suite (ChAS, v.3.1.0) para a geração das imagens.

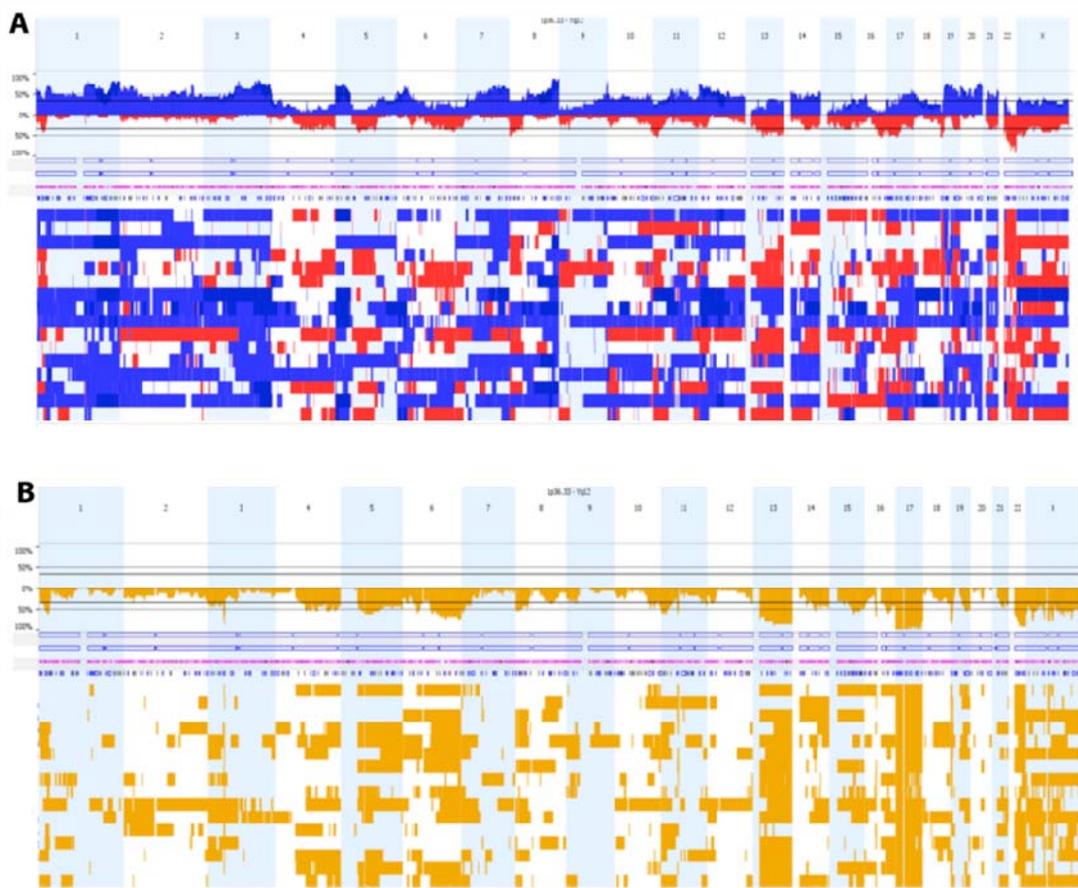


Figura 9 - A. Alteração de número de cópias de todos os cromossomos em todas as amostras estudadas. Na parte superior é indicada a numeração dos cromossomos e a porcentagem das amostras com alterações encontradas em cada segmento, cada linha horizontal refere-se a um caso. Os ganhos genômicos estão representados em azul e as perdas em vermelho. **B. Distribuição da cnLOH e delLOH em todo o genoma considerando todos os casos.** Na parte superior é indicada a numeração dos cromossomos e a porcentagem das amostras com alterações encontradas em cada segmento, na parte inferior são mostradas as regiões de cnLOH e delLOH (amarelo) em cada uma das amostras representadas uma em cada linha horizontal. Figura gerada usando o software Nexus (v7.5)

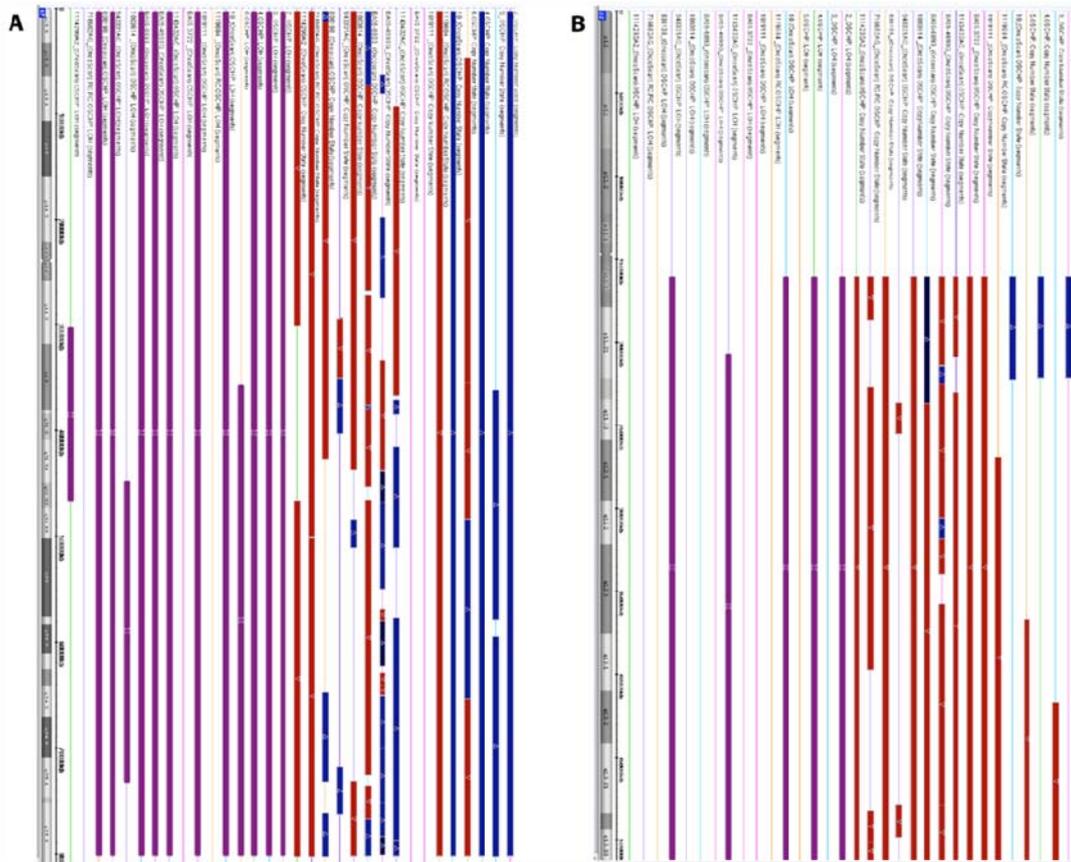


Figura 10 - Representação esquemática dos cromossomos 17 e 22. As cnLOH estão representadas em roxo, os ganhos em azul e as perdas em vermelho. Pode ser observado que um significativo número de casos apresentou cnLOH no cromossomo 17, enquanto o cromossomo 22 apresentou um grande número de casos com perdas do braço longo. Foi utilizado o software Chromosome Analysis Suite (ChAS, v.3.1.0) para a geração das imagens.

Os gráficos mostrando o log₂ ratio e a frequência do alelo B do genoma completo de cada paciente estão descritos no Anexo 5. As alterações segmentares de cada caso estão descritas em Tabelas no Anexo 6.

Um caso (caso 28) teve duas amostras distintas coletadas no momento da citorredução primária e que foram submetidas ao ensaio ONCOSCAN. Uma amostra proveniente de tumor no ovário direito (28A) e outra de tumor do ovário esquerdo (28B). As alterações estruturais encontradas foram semelhantes, entretanto, algumas

alterações foram distintas: a amostra 28A apresentou ganho parcial em 2q enquanto a amostra 28B apresentou ganho de todo o braço longo; no cromossomo 4 houve cnLOH de todo o cromossomo na amostra 28A, enquanto na 28B o cromossomo 4 não apresentou esta alteração; a amostra 28A apresentou dois segmentos com cnLOH no cromossomo 7 que não estavam presentes na amostra 28B; ganhos envolvendo parcialmente 8p e 8q foram observados na amostra 28A enquanto em 28B foi verificada uma região do cromossomo 8 envolvida em cnLOH, a amostra 28A apresentou uma deleção em 9p e um ganho em 9q enquanto a amostra 28B não possuía estas alterações; ganhos envolvendo 10p e 10q foram detectados na amostra 28A enquanto em 28B foi observada uma região de cnLOH envolvendo este cromossomo; a amostra 28A apresentou uma cnLOH envolvendo todo o cromossomo 16 e a amostra 28B não apresentou alterações nesse cromossomo; a amostra 28A apresenta uma cnLOH no cromossomo 19p e a amostra 28B não apresenta alterações nesse cromossomo (Figura 11).

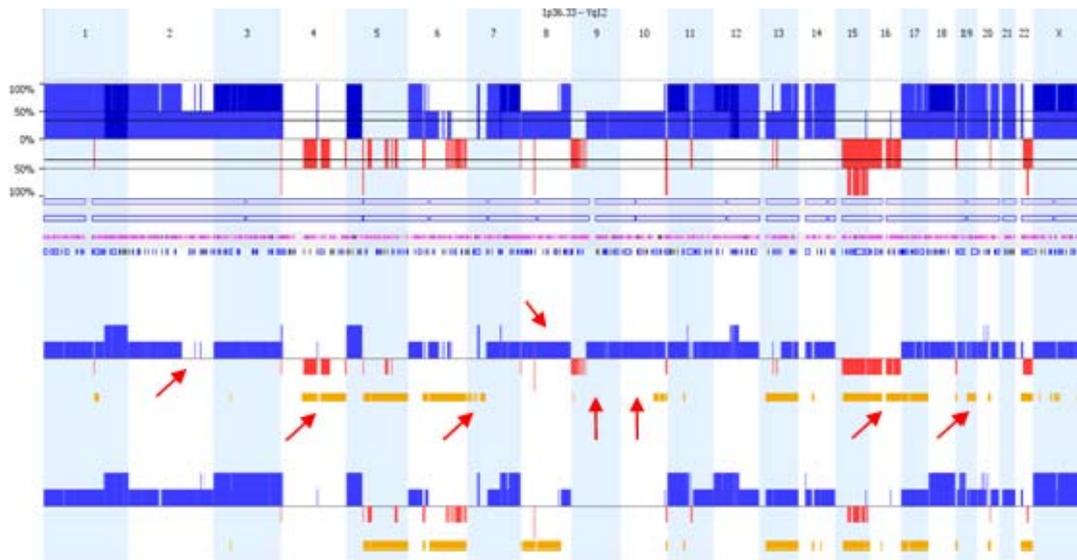


Figura 11 - Comparação das alterações estruturais no genoma de duas amostras de tumor do caso 28. Na parte superior é indicada a numeração dos cromossomos e a porcentagem das amostras com alterações encontradas em cada segmento. Na parte inferior são mostradas as alterações estruturais (ganhos: azul, vermelhos: perdas, cnLOH e delLOH: amarelo) na amostra 28A na primeira linha e 28B na segunda linha. Os segmentos com alterações estruturais distintas entre as amostras estão indicados pelas setas vermelhas.

Dez das 15 amostras analisadas eram tumores primários obtidos antes de qualquer tratamento quimioterápico e cinco eram provenientes de tumores no momento da recidiva após tratamento com quimioterapia. O perfil de alterações estruturais desses dois grupos de tumores se mostrou semelhante (Figura 12).

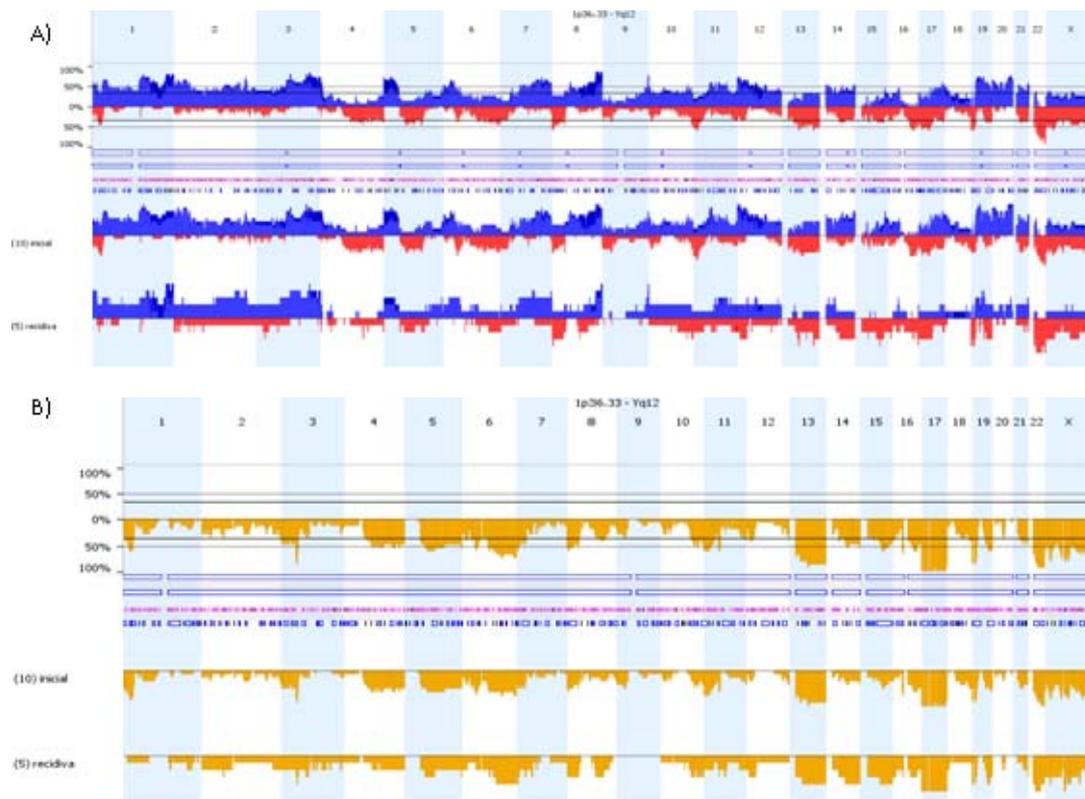


Figura 12 - Comparação entre as alterações genômicas das amostras de tumores primários sem tratamento prévio e dos tumores coletados no momento da recidiva após tratamento quimioterápico **A)** Perfil de alterações de número de **cópias**. Na parte superior é indicada a numeração dos cromossomos e a porcentagem das amostras com alterações encontradas em cada segmento. Na parte inferior são mostradas as alterações estruturais (ganhos: azul, vermelho: perdas). **B) Perfil de cnLOH e delLOH**. Na parte superior é indicada a numeração dos cromossomos e a porcentagem das amostras com alterações encontradas em cada segmento. Na parte inferior são mostrados os segmentos com cnLOH e delLOH (amarelo).

Além das alterações genômicas, esta plataforma também permite avaliar mutações em nove genes. Foi possível identificar mutações no gene *NRAS* (casos 28 e 29), *TP53* (casos 10 e 16) e no gene *PTEN* (caso 10) (Tabela 6).

Tabela 6 - Mutações detectadas em cinco das 15 amostras testadas de 14 pacientes com câncer de ovário.

Paciente	Mutação	Escore da Mutação	Nome/Significado/banco de dados
10	<i>TP53</i> :p.H179R:c.536A>G	2,19827E+15	IARC(variante nova)/ deleteria rs121909224/
10	<i>PTEN</i> :p.R130*:c.388C>T	6,03152E+15	Patogênica/ CLINVAR ¹ rs28934578/
16	<i>TP53</i> :p.R175H:c.524G>A	2,02837E+15	patogênica/ CLINVAR ²
28	<i>NRAS</i> :p.G12D:c.35G>A	5,35131E+15	rs121913237 / patogênica / CLINVAR ³ rs11554290/
29	<i>NRAS</i> :p.Q61R:c.182A>G	8,88962E+15	patogênica/ CLINVAR ⁴

1: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/7819/>;

2: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/12374/>;

3: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/39648/>;

4: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/13900/>;

A paciente 10 apresentou além da mutação em *PTEN* descrita, perda na região de *PTEN* no cromossomo 10 com número de cópias médio de 1,67, com perda de heterozigose da região.

4.4 PONTUAÇÃO DOS ESCORES DE DEFICIÊNCIA DA VIA DA RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA

Os escores foram analisados conforme descrito em Material e Métodos. A maior parte dos tumores apresentou instabilidade genômica com alterações de número de cópias e regiões de cnLOH.

O número de alterações contabilizado em cada cromossomo para o cálculo de cada escore assim como o resultado final de cada escore para cada paciente é apresentado nas Tabelas 7 a 10.

Tabela7 – Contagem de regiões subteloiméricas com alelos não balanceados por cromossomo para cálculo do escore *Telomeric Allelic Imbalance (TAI)*.

ID / Cr	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	Total	
1	2	0	2	1	2	2	1	2	0	2	2	1	1	1	1	2	0	1	1	2	1	1	1	29	
2	1	2	0	2	1	1	1	1	0	0	2	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	19	
3	2	2	2	2	2	2	1	2	0	2	0	2	1	1	1	2	1	2	2	2	0	1	1	33	
4	1	1	1	1	2	1	1	2	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	2	0	1	1	19	
7	2	1	2	2	0	2	2	0	2	1	1	1	1	0	1	1	1	2	1	1	0	1	1	26	
10	1	1	1	1	1	2	1	2	0	0	2	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	20	
15	1	1	1	1	1	2	1	0	1	0	0	0	1	0	1	2	1	0	0	1	0	0	0	15	
16	2	2	2	1	1	1	1	2	0	1	2	1	1	0	0	2	2	2	2	2	2	0	1	2	30
19	0	2	2	1	1	0	1	0	2	1	2	2	1	0	0	0	0	0	2	0	1	1	0	19	
20	2	1	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	2	0	1	1	0	12	
25	1	1	0	1	1	2	2	1	1	1	2	2	1	1	1	0	1	0	2	2	1	1	1	26	
27	1	1	1	2	1	1	1	2	1	0	1	2	1	1	1	0	1	1	2	0	1	1	1	24	
28	2	0	1	0	2	2	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	2	2	0	1	1	21	
28	2	1	1	0	2	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	2	0	1	1	18	
29	2	1	0	0	0	0	2	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	2	0	1	1	0	14	

ID = identificação da paciente; Cr = cromossomo

0 = nenhuma região subteloimérica com alelos não balanceados neste cromossomo; 1 = uma região subteloimérica com alelos não balanceados neste cromossomo; 2 = uma região subteloimérica com alelos não balanceados neste cromossomo

Tabela 8 - Contagem de regiões subteloéricas com alelos não balanceados por cromossomo para cálculo do escore *Telomeric Allelic Imbalance (TAI)* modificado

ID / Cr	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	Total
1	2	0	2	1	2	2	1	2	0	2	1	0	1	1	0	2	0	1	1	0	0	1	1	23
2	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	2	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	12
3	2	2	2	1	1	1	1	2	0	1	0	0	1	1	1	1	1	2	1	1	0	0	1	23
4	1	1	1	1	2	1	1	2	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	2	0	1	1	19
7	2	1	2	2	0	2	1	0	2	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	17
10	0	1	1	1	1	2	0	1	0	0	2	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	16
15	1	1	1	1	0	2	1	0	0	0	0	0	1	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	11
16	2	1	2	1	0	1	1	2	0	1	2	1	1	0	0	1	0	0	0	2	0	1	2	21
19	0	2	2	1	1	0	1	0	2	1	2	2	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	18
20	2	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	9
25	1	0	0	1	1	1	2	1	1	0	2	2	1	0	1	0	1	0	2	1	1	1	1	21
27	1	1	1	2	1	1	0	2	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	19
28	1	0	1	0	2	2	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	2	0	1	1	17
28	1	1	1	0	2	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	2	0	1	1	16
29	2	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	8

ID = identificação da paciente; Cr = cromossomo

0 = nenhuma região subteloérica com alelos não balanceados neste cromossomo; 1 = uma região subteloérica com alelos não balanceados neste cromossomo; 2 = duas regiões subteloéricas com alelos não balanceados neste cromossomo

Tabela 9 - Contagem de regiões de perda de heterozigose (cnLOH ou L) > 15 MBp e menores que 1 cromossomo para cálculo do escore de perda de heterozigose cnLOH+L

ID / Cr	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	Total
1	2	1	2	2	1	2	1	2	0	3	2	1	1	2	1	2		1	2	0	0	1	1	30
2	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0		0	1	0	1	1	2	9
3	2	2	1	0	0	0	1	0	1	2	0	0	1	0	0	1		0	0	0	0	0	1	12
4	0	0	0	1	1	1	2	0	0	0	0	0	1	0	1	0		0	0	0	0	1	0	8
7	1	0	2	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1		1	0	1	0	1	1	12
10	3	2	1	1	1	2	2	1	0	0	3	0	1	1	1	2		0	1	0	1	1	2	26
15	1	1	0	1	1	1	1	2	0	0	0	1	1	1	1	1		0	1	0	0	1	0	15
16	1	0	1	1	1	1	2	1	0	1	2	1	1	0	0	1		0	0	0	1	1	2	18
19	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0		0	1	0	1	1	0	13
20	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	1	1	1	0		0	0	0	0	1	0	6
25	2	0	0	3	1	2	1	1	1	0	2	1	1	1	1	0		0	0	0	1	0	0	18
27	1	1	0	2	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0		1	1	0	1	1	1	15
28	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0		0	0	0	0	1	0	7
28	0	0	0	1	1	1	2	0	1	1	0	0	0	0	1	0		0	1	0	0	1	0	10
29	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0		0	1	0	0	1	0	7

ID = identificação da paciente; Cr = cromossomo

0 = nenhuma região de cnLOH ou deleção neste cromossomo; 1 = uma região região de cnLOH ou deleção neste cromossomo; 2 = duas regiõesde cnLOH ou deleção neste cromossomo

Tabela 10 – Contagem de pontos de quebra cromossômica entre grandes regiões para cálculo do escore de *Large Scale transition (LST)*

ID / Cr	1p	1q	2p	2q	3p	3q	4p	4q	5p	5q	6p	6q	7p	7q	8p	8q	9p	9q	10p	10q	11p	11q	12p	12q
1	2	0	1	2	3	3	0	1	1	1	1	1	1	2	0	2	0	2	1	1	1	0	1	0
2	0	1	2	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
3	0	2	0	0	1	2	1	1	0	2	1	1	1	2	0	0	0	0	1	2	1	2	1	2
4	0	2	4	2	0	1	2	2	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0
7	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
10	4	3	0	0	0	2	0	1	1	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1
15	0	3	0	2	2	2	1	1	0	3	1	3	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0
16	2	1	1	0	1	2	0	0	1	3	0	1	1	4	0	2	0	0	0	0	2	1	1	0
19	1	0	1	1	1	1	2	2	0	2	1	0	1	0	0	4	0	1	0	0	1	2	0	1
20	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0
25	3	0	0	0	0	0	0	3	1	1	1	1	3	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1
27	1	0	1	1	0	2	0	3	0	1	1	1	0	1	1	1	0	3	0	0	1	0	0	0
28	1	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
28	1	1	3	0	0	1	0	3	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1
29	1	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	0	1	0	1	0	0	0	0

ID = identificação da paciente; Cr = cromossomo

0 = nenhum ponto de quebra entre grandes regiões neste cromossomo; 1 = ponto de quebra entre grandes regiões neste cromossomo ; 2 = dois pontos de quebra entre grandes regiões neste cromossomo 3 = três pontos de quebra entre grandes regiões neste cromossomo

Cont/ Tabela 10

ID/ Cr	13q	14q	15q	16p	16q	7p	7q	8p	8q	9p	9q	0p	0q	1q	2p	3p	3q	Total	Nº Cr estimado	Ploidia estimada
1	0	1	2	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	2	36	42,475	2
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	11	56,45	2
3	1	0	2	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2	31	66,25	4
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	18	62,365	4
7	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	14	60,58	4
10	0	1	2	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	27	43,09	2
15	0	1	2	1	2	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	31	44,61	2
16	2	0	0	0	1	0	0	0	2	0	1	1	1	1	0	1	1	34	46,75	2
19	1	2	0	0	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	28	40,25	2
20	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	54	2
25	0	1	0	0	0	0	2	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	26	44,5	2
27	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	4	28	44,305	2
28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	68,35	4
28	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	17	59,27	2
29	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	40	2

ID = identificação da paciente; Cr = cromossomo

0 = nenhum ponto de quebra entre grandes regiões neste cromossomo; 1 = ponto de quebra entre grandes regiões neste cromossomo ; 2 = dois pontos de quebra entre grandes regiões neste cromossomo 3 = três pontos de quebra entre grandes regiões neste cromossomo

Tabela 11 - Valor dos escores de deficiência de recombinação homóloga por paciente

ID	TAI	TAI modificado	cnLOH+L	LST	LST modificado	HRD escore
1	29	23	30	36	5	19,33
2	19	12	9	11	-20	0,33
3	33	23	12	31	-31	1,33
4	19	19	8	18	-44	-5,7
7	26	17	12	14	-48	-6,33
10	20	16	26	27	-4	12,67
15	15	11	15	31	0	8,67
16	30	21	18	34	3	14,00
19	19	18	13	28	-3	9,33
20	12	9	6	5	-26	-3,67
25	26	21	18	26	-5	11,33
27	24	19	15	28	-3	10,33
28	21	17	7	6	-47	-7,00
28	18	16	10	17	-14	4,0
29	14	8	7	10	-21	-2,00

Cada escore calculado pelo somatória do número de alterações contabilizados em cada cromossomo

Escore LST modificado = LST – kP, onde P é a ploidia e k é a constante 15,5

Escore HRD = (TAIm + cnLOH+L + LSTm)/3

O escore baseado no TAI (*Telomeric Allelic Imbalance*) revelou uma variação de 12 (caso 20) a 33 (caso 3) regiões subtelo méricas envolvidas em alterações genômicas não balanceadas, com uma mediana de 19,5 (P25-75 = 17,3 a 26,8) (Tabela 7). Em adição, o escore TAI modificado mostrou uma variação de 8 (caso 29) a 23 regiões não balanceadas (casos 1 e 3), com uma mediana de 17,5 (P25-75 = 11,8 a 21,0) (Tabela 11).

O escore cnLOH+L considera regiões de cnLOH e delLOH de tamanhos superiores a 15 MBp e menores que o tamanho do cromossomo inteiro excluindo o cromossomo 17 (com o maior número de cnLOH). Esta análise revelou uma variação de 6 (caso 20) a 30 cnLOH+L (caso 1) com uma mediana de 12,5 (P25-75 = 8,8 a

18,0) (Tabela 9).

O cálculo do escore de *Large Scale transition* (LST) é baseado na contagem de pontos de quebras cromossômicos. Esta análise resultou em uma variação de 5 (caso 29) a 36,0 (caso 1) pontos de quebra com uma mediana 26,0 (P25-75 = 13,25 a 31,00) (Tabela 10).

O escore LST modificado, ajustando o escore LST pela ploidia conforme a fórmula $LST_m = LST - kP$, onde P é a ploidia e k é a constante 15,5, revelou uma variação entre -48 (caso 7) e +5 (caso 1) com uma mediana de -9,5 (P25-75 = -27,25 a 2,25) (Tabela 11).

O escore HRD, calculado pela média aritmética da soma dos escores $TAIm + cnLOH+L + LST_m$, revelou uma variação entre -6,30 (caso 28A) e 19,33 (caso 1) com uma mediana de 6,33 (P25-75 = -2,42 a 11,66) (Tabela 11). A Tabela 11 resume os dados de todos os escores em cada caso do estudo.

Os escores LOH e LST possuem limiares já descritos em literatura para a definição de deficiência da via de recombinação homóloga. Esses pontos de corte são: 10 para o escore de $cnLOH+L$, e para o escore de LST de acordo com a ploidia. A deficiência da via da recombinação homóloga é considerada quando os tumores “quase diploides” apresentam mais de 15 LST e os tumores “quase tetraploides” acima de 20 LST. Utilizando-se esses limiares, 10 tumores de 10 pacientes foram classificados como tendo deficiência da via da recombinação homóloga pelo escore HRD enquanto 9 foram classificados como deficientes pelo escore LST.

4.5 CONCORDÂNCIA E CORRELAÇÃO ENTRE OS ESCORES DE DEFICIÊNCIA DA VIA DA RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA

Os escores cnLOH+L e LST foram categorizados de acordo com os limiares descritos em literatura. Estes escores permitem a distinção entre pacientes com deficiência da via da recombinação homóloga daqueles sem a deficiência da via da recombinação homóloga. O teste de concordância entre estes dois escores revelou um índice Kappa de 0,837, o que demonstrou excelente concordância.

Para avaliar a correlação entre os escores como variáveis contínuas realizamos o teste de correlação de Spearman entre os três escores originais TAI, cnLOH+L e LST. A correlação mais forte foi observada entre os escores cnLOH+L e LST com uma correlação forte com coeficiente de 0,79 ($p = 0,001$). A correlação entre cnLOH+L e TAI foi moderada com coeficiente de 0,63 ($p = 0,015$) e a correlação entre TAI e LST foi moderada com coeficiente de 0,64 ($p = 0,012$) (Figura 13).

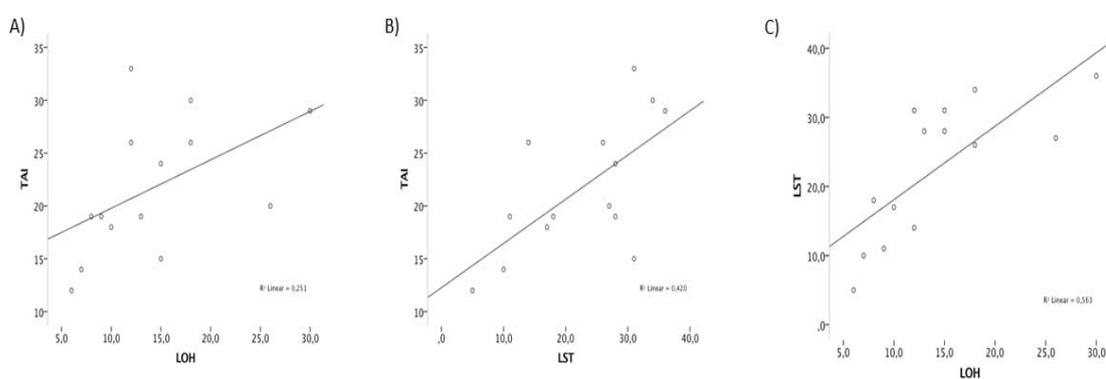


Figura 13 - Correlação entre os escores. A) Escore TAI (eixo y) e escore cnLOH+L (eixo x) B) Escore TAI (eixo y) e escore LST (eixo x) C) Escore LST (eixo y) e escore cnLOH+L (eixo x)

4.6 AVALIAÇÃO DE RESPOSTA

As 14 pacientes testadas pelo SNP *array* tiveram a resposta ao tratamento de reexposição à platina reavaliada conforme descrito na Tabela 12:

Tabela 12 - Revisão de resposta ao tratamento de reexposição à platina das pacientes testadas pelo método de SNP *array*

ID	CA125 pré tratamento	CA125 pós tratamento	CA125 Confirmação	Lesão pré tratamento	Lesão pós tratamento	Conclusão
1	92,3	79	24,2	Peritonio 63mm	Peritonio 47mm	RP
2	2600	3004	-	Espessamento peritoneal	Lesão hepática nova 24x13mm	PD
3	1174	222,9	71,5	Derrame pleural	Resolução de derrame pleural*	RP
4	258	331	-	SUV Peritonio 3,0 Epiplon 1,9 Alças 3,0	SUV Peritonio 11,6 Epiplon 3,7 Alças 9,45	PD
7	-	-	-	-	Suboclusão intestinal	PD
10	4430	1887	2180	Pelve 101mm	Pelve 90mm	RP
15	546	81,6	60	Pré sacral 117mm	Pré sacral 106mm	RP
16	52,2	94,6	185	-	Lesão cerebral nova	PD
19	35	18,6	0	SUV 11,0 fígado 3,2 suprarrenal 8,0 presacral	Ausência de captação PET-CT	RC
20	40,9	20,1	17,1	Peritonio 31mm	Peritonio 26mm	DE
25	-	-	-	-	Suboclusão intestinal	PD
27	637	1143	-	Fígado 45mm	Fígado 54mm	PD
28	102,9	32,2	-	SUV pelve 4,54	Ausência de captação PET-CT	RC
29	115	62	31	Pleura 72mm	Pleura 70mm	RP

RC = resposta completa, RP = resposta parcial, DE = doença estável, PD = progressão de doença, SUV = *Standard Uptake Value*, medida de captação da cintilografia por emissão de pósitrons.

*Não houve pleurodese ou toracocentese entre as duas avaliações por imagem do derrame pleural

Sete das 14 pacientes apresentaram resposta ao tratamento de reexposição à platina, mostrando uma taxa de resposta de 50%. Entre as 14 pacientes, quatro não possuíam CA125 confirmatório da resposta. Duas dessas pacientes (paciente 2 e 27) tiveram sua resposta determinada pelo exame de imagem de acordo com RECIST. As outras duas foram avaliadas por PET-CT sem descrição da medida das lesões. A paciente 4 apresentou aumento da SUV em todas as lesões e foi considerada como apresentando progressão de doença. A paciente 28 apresentou ausência de captação ao PET-CT sendo considerada como tendo resposta completa por ter apresentado normalização do marcador na única medida pós tratamento.

As pacientes 7 e 25 não tinham exames de imagem descritos no prontuário eletrônico, porém ambas apresentaram progressão de doença clínica inequívoca após o tratamento de reexposição à platina com quadro de suboclusão intestinal.

4.7 ASSOCIAÇÃO ENTRE OS ESCORES DE DEFICIÊNCIA DA VIA DA RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA E RESPOSTA AO TRATAMENTO DE REEXPOSIÇÃO À PLATINA

A associação entre a resposta ao tratamento e os escores foi avaliada categorizando-os por limiares previamente estabelecidos (cnLOH+L e LST) ou pela mediana da coorte (TAI, TAI_m, LST_m e HRD). Seis de 10 pacientes com escore cnLOH+L elevado apresentaram resposta ao tratamento enquanto uma de quatro pacientes com escore cnLOH+L baixo apresentou resposta ($p = 0,280$) (Figura 14A). Cinco de nove pacientes com escore LST elevado apresentaram resposta favorável ao tratamento enquanto uma de cinco pacientes com escore LST baixo apresentou

resposta ($p = 0,133$) (Figura 14B) (Tabela 13).

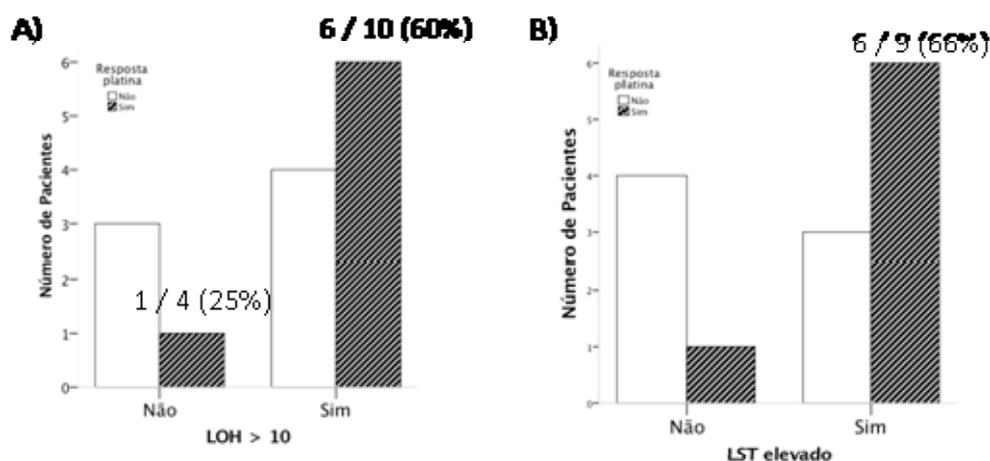


Figura 14 - Taxa de resposta após tratamento com reexposição à platina de acordo com a classificação por escore de deficiência de recombinação homóloga. (A) cnLOH+L, (B) LST

Tabela 13 – Taxa de resposta à reexposição à platina de acordo com pontuação dos escores de deficiência da via da recombinação homóloga

Escore		Resposta	Não Resposta	p
TAI	< mediana	4 / 7 (57,1%)	3 / 7 (42,9%)	1,000
	> mediana	3 / 7 (42,9%)	4 / 7 (57,1%)	
TAI modificado	< mediana	4 / 7 (57,1%)	3 / 7 (42,9%)	1,000
	> mediana	3 / 7 (42,9%)	4 / 7 (57,1%)	
cnLOH+L	< 10	1 / 4 (25,0%)	3 / 4 (75,0%)	0,280
	> 10	6 / 10 (60,0%)	4 / 10 (40,0%)	
LST	< 15 se 2N ou < 20 se 4N	1 / 5 (20,0%)	4 / 5 (80,0%)	0,266
	> 15 se 2N ou > 20 se 4N	6 / 9 (66,7%)	3 / 9 (33,3%)	
LST modificado	< mediana	3 / 7 (42,9%)	4 / 7 (57,1%)	1,000
	> mediana	4 / 7 (57,1%)	3 / 7 (42,9%)	
HRD	< mediana	3 / 7 (42,9%)	4 / 7 (57,1%)	1,000
	> mediana	4 / 7 (57,1%)	3 / 7 (42,9%)	

2N = próximo ao diploide; 4N = próximo ao tetraplóide

A análise da distribuição da pontuação dos escores entre os grupos de pacientes que responderam ao tratamento de reexposição à platina e as que não responderam revelou valores maiores dos escores *cnLOH+L*, *LST*, *LSTm* e *HRD* no grupo de paciente respondedoras e valores maiores dos escores *TAI* e *TAIm* no grupo de pacientes não respondedoras. As medianas de cada escore no grupo de respondedoras *versus* não respondedoras foram: *TAI* = 19,0 *versus* 24,0, *TAIm* = 16,0 *versus* 19,0, *LOH* 13 *versus* 12, *LST* = 28,0 *versus* 18,0, *LSTm* = -4,0 *versus* -20,0, *HRD* 8,7 *versus* 0,33. Essas diferenças, porém, não foram estatisticamente significativas (Figura 15).

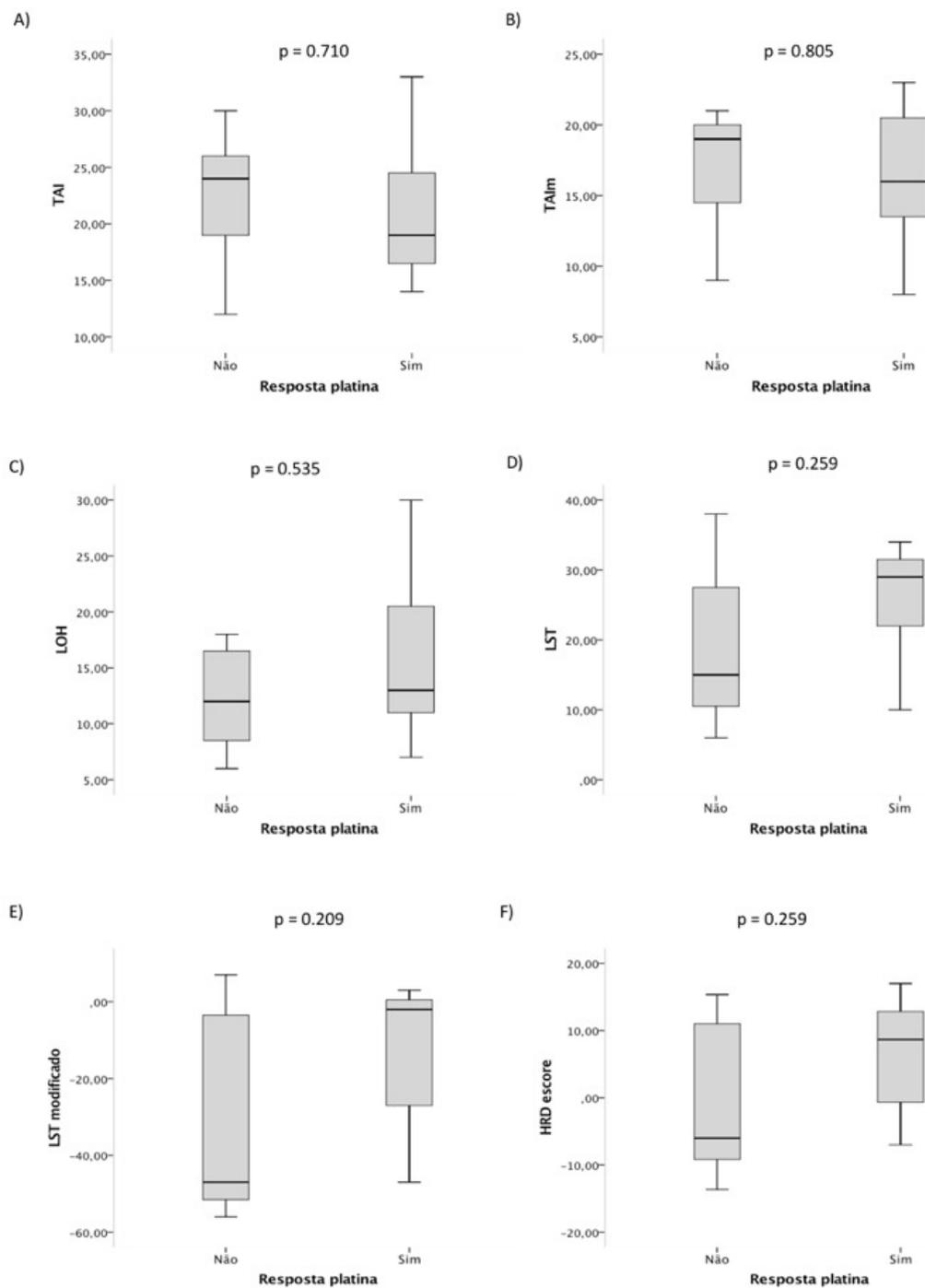


Figura 15 - Distribuição dos valores dos escores de deficiência da via da recombinação homóloga de acordo com a resposta ao tratamento de reexposição à platina. (A) TAI, (B) TAI_m, (C) cnLOH+L, (D) LST, (E) LST_m e (F) HRD.

4.8 ASSOCIAÇÃO ENTRE OS ESCORES DE DEFICIÊNCIA DA VIA DA RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA E A SOBREVIDA GLOBAL

A sobrevida global a partir do início do tratamento de reexposição à platina na coorte inteira foi de 13,3 meses (IC 95%, 9,5 – 17,2 meses). A sobrevida global desde o diagnóstico inicial foi de 42,7 meses (IC 95%, 36,5 – 48,8 meses) (Figura 16).

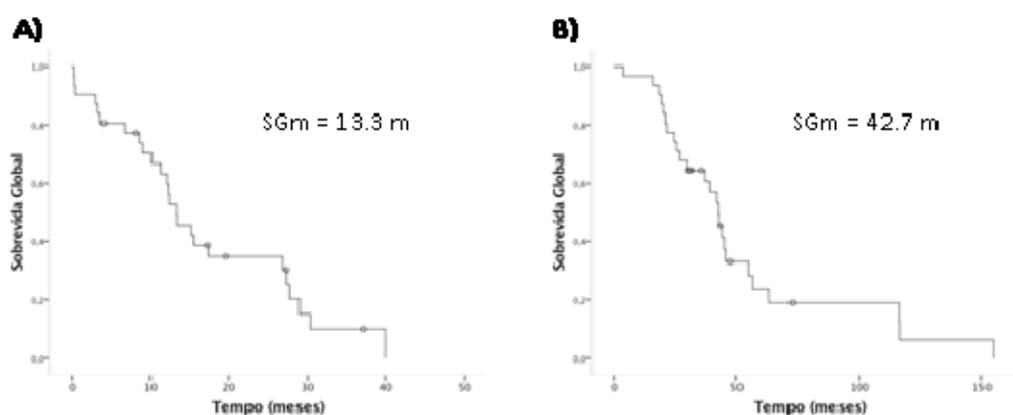


Figura 16 – Sobrevida global. (A) na reexposição à platina, (B) desde o diagnóstico inicial

Não foram observadas diferenças na sobrevida global a partir do tratamento em estudo de acordo com os valores dos escores avaliados (Figura 17).

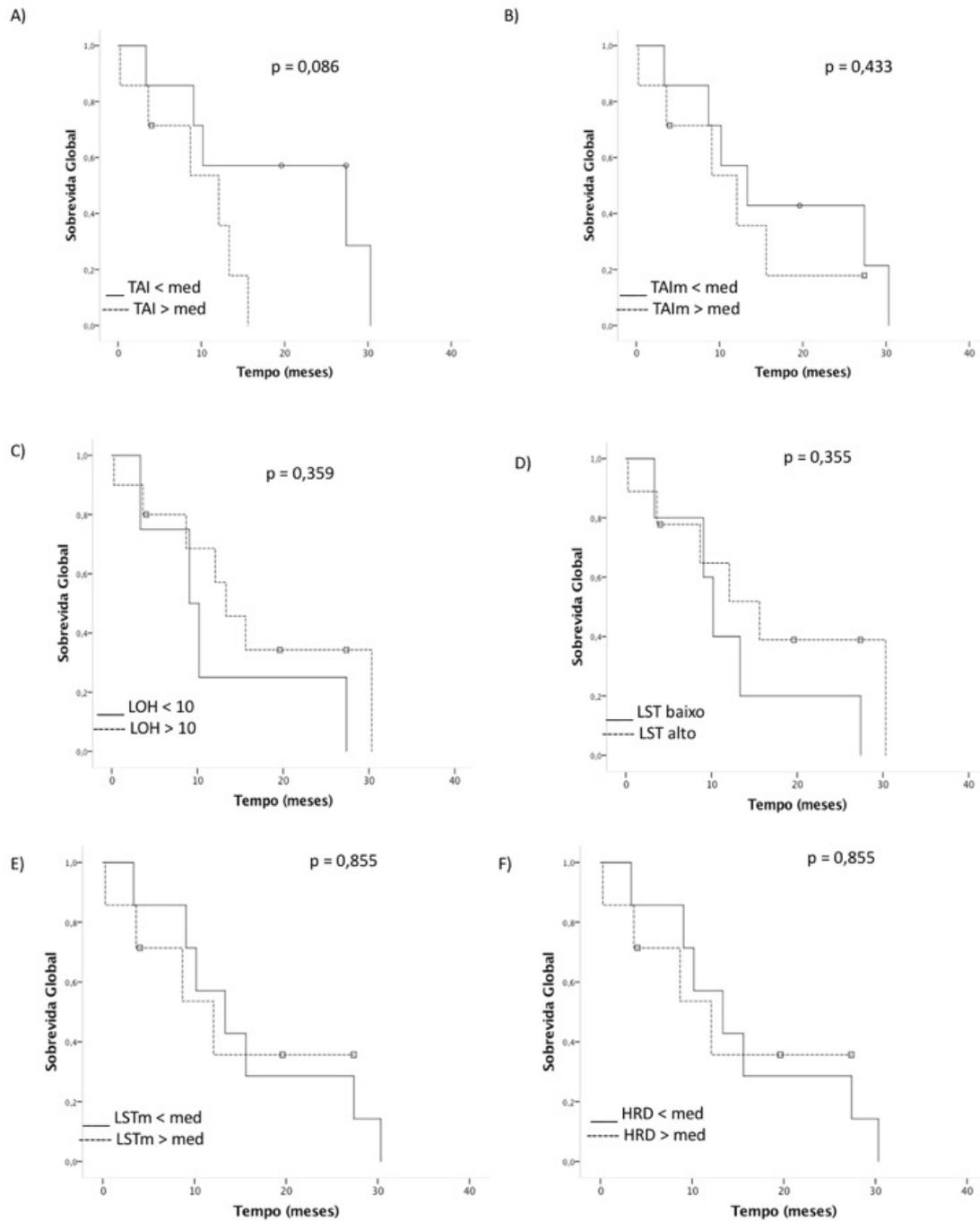


Figura 17 - Sobrevida global na reexposição à platina de acordo com escores. (A) TAI, (B) TAI_m, (C) cnLOH+L, (D) LST, (E) LST_m e (F) HRD

4.9 ASSOCIAÇÃO FATORES CLÍNICO PATOLÓGICOS COM ESCORES DE DEFICIÊNCIA DA VIA DE RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA E RESPOSTA AO TRATAMENTO

Dentre os fatores clínico e patológicos avaliados, os fatores associados tanto a um escore TAI quanto a um escore TAI_m menores foram a idade maior que 65 anos e o intervalo livre de platina (Figuras 18 e 19).

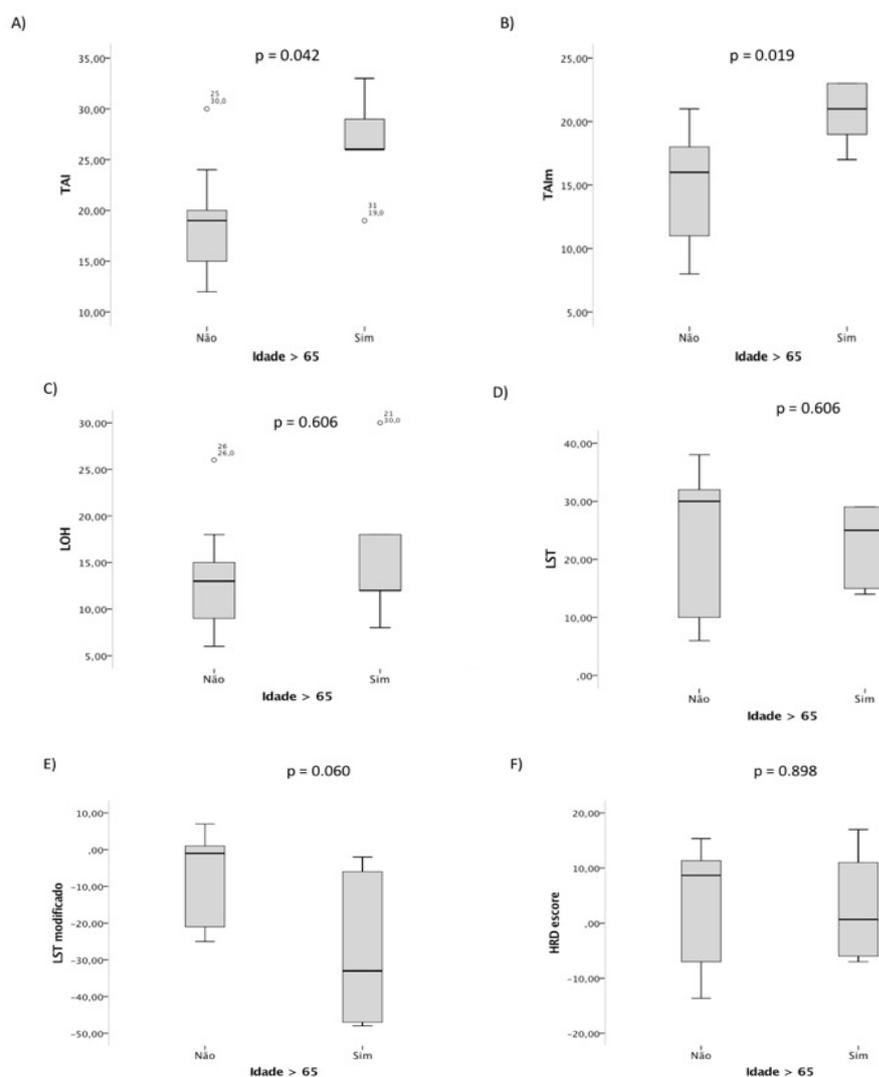


Figura 18 - Distribuição dos escores de deficiência de recombinação homóloga de acordo com a idade. (A) TAI, (B) TAI_m, (C) cnLOH+L, (D) LST, (E) LST_m e (F) HRD.

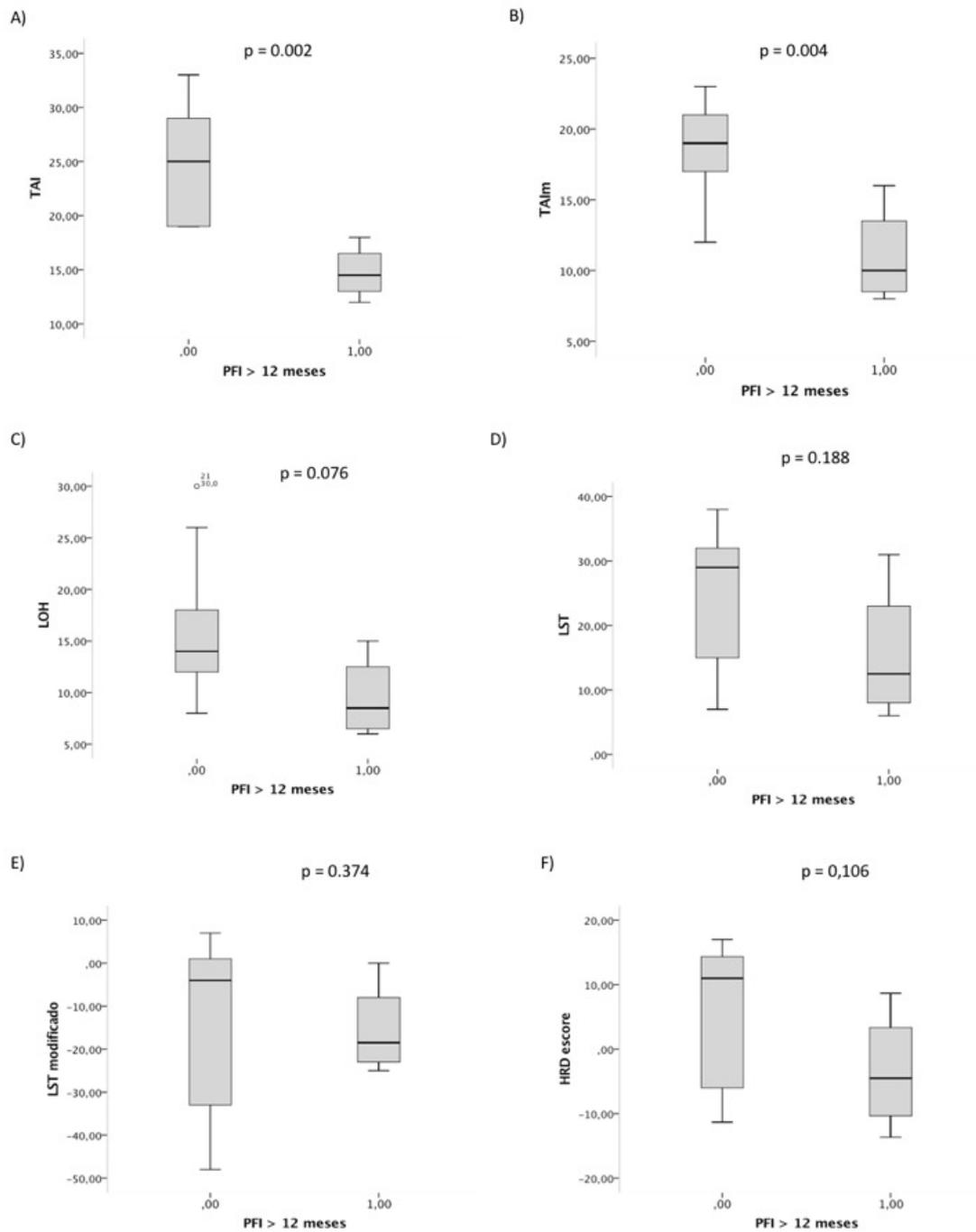


Figura 19 - Distribuição dos escores de deficiência de recombinação homóloga de acordo com o intervalo livre de platina maior que 12 meses. (A) TAI, (B) TAI_m, (C) cnLOH+L, (D) LST, (E) LST_m e (F) HRD

Entre as 31 pacientes da coorte apenas uma apresentava um carcinoma de células claras de ovário (caso 6), o qual era sugestivo de não estar relacionado à via de recombinação homóloga. Entre as pacientes que foram testadas pelo SNP *array* uma possuía um tumor endométrioide (caso 16) que apresentou todos os escores de deficiência de recombinação homólogo elevados e duas possuíam carcinoma indiferenciado (caso 3 e 4), sendo uma com escores elevados a outra com escores baixos.

O impacto das variáveis clínico-patológicas na resposta ao tratamento de reexposição à platina foi avaliado em todos os 31 pacientes deste estudo. Dentre as pacientes com história familiar positiva, 8 de 10 (80,0%) apresentaram resposta favorável ao tratamento de reexposição à platina, enquanto nas pacientes sem história familiar 7 de 19 (36,8%) pacientes responderam ao tratamento ($p = 0,050$) (Figura 20). Dentre as pacientes com intervalo livre de platina maior que 12 meses, 07 de 09 (77,8%) apresentaram resposta favorável ao tratamento, enquanto 09 de 22 (40,9%) com intervalo livre de platina menor que 12 meses responderam ao tratamento ($p = 0,113$) (Tabela 14).

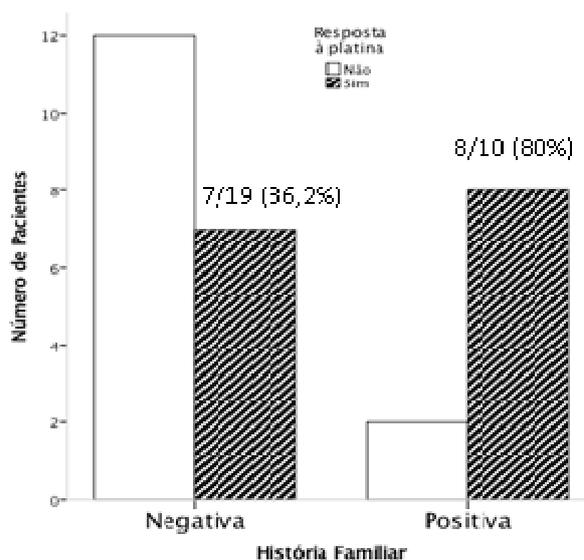


Figura 20 - Taxa de resposta após tratamento com reexposição à platina de acordo com história familiar.

Tabela 14 – Taxa de resposta à reexposição à platina de acordo com características clínicas

Característica clínica		Resposta Platina	Não Resposta Platina	p
Idade	< 65 anos	11 / 21 (52,4%)	10 / 21 (47,6%)	1,000
	> 65 anos	05 / 10 (50,0%)	05 / 10 (50,0%)	
História familiar	Negativa	07 / 19 (36,8%)	12 / 19 (63,2%)	0,050
	Positiva	08 / 10 (80,0%)	02 / 10 (20,0%)	
Histologia	Seroso de alto grau	14 / 25 (56,0%)	11 / 25 (44,0%)	0,583
	Outros	01 / 03 (33,3%)	02 / 03 (66,7%)	
PFI	< 12 meses	09 / 22 (40,9%)	13 / 22 (59,1%)	0,113
	> 12 meses	07 / 09 (77,8%)	02 / 09 (22,2%)	
Resistência primária	Não	06 / 12 (50,0%)	06 / 12 (50,0%)	1,000
	Sim	10 / 19 (51,6%)	9 / 10 (48,4%)	
Nº linhas prévias	< 3	06 / 11 (54,4%)	05 / 11 (45,5%)	1,000
	> 3	10 / 20 (50,0%)	10 / 20 (50,0%)	
Quimioterapia	Platina + taxano	09 / 15 (53,3%)	07 / 13 (46,7%)	1,000
	Outros	08 / 08 (50,0%)	08 / 08 (50,0%)	

4.10 COMPARAÇÃO ENTRE OS ESCORES DE DEFICIÊNCIA DA VIA DE RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA EM TUMORES PRIMÁRIOS E RECIDIVAS E ENTRE DUAS AMOSTRAS DE UMA MESMA PACIENTE

O escore TAI e TAI_m mostraram-se mais elevados no grupo de tumores primários quando comparadas as amostras com aquelas dos tumores recidivados. Para os outros escores não houve diferença estatisticamente significativa, ainda que se note uma diferença no valor mediano dos escores (Figura 21).

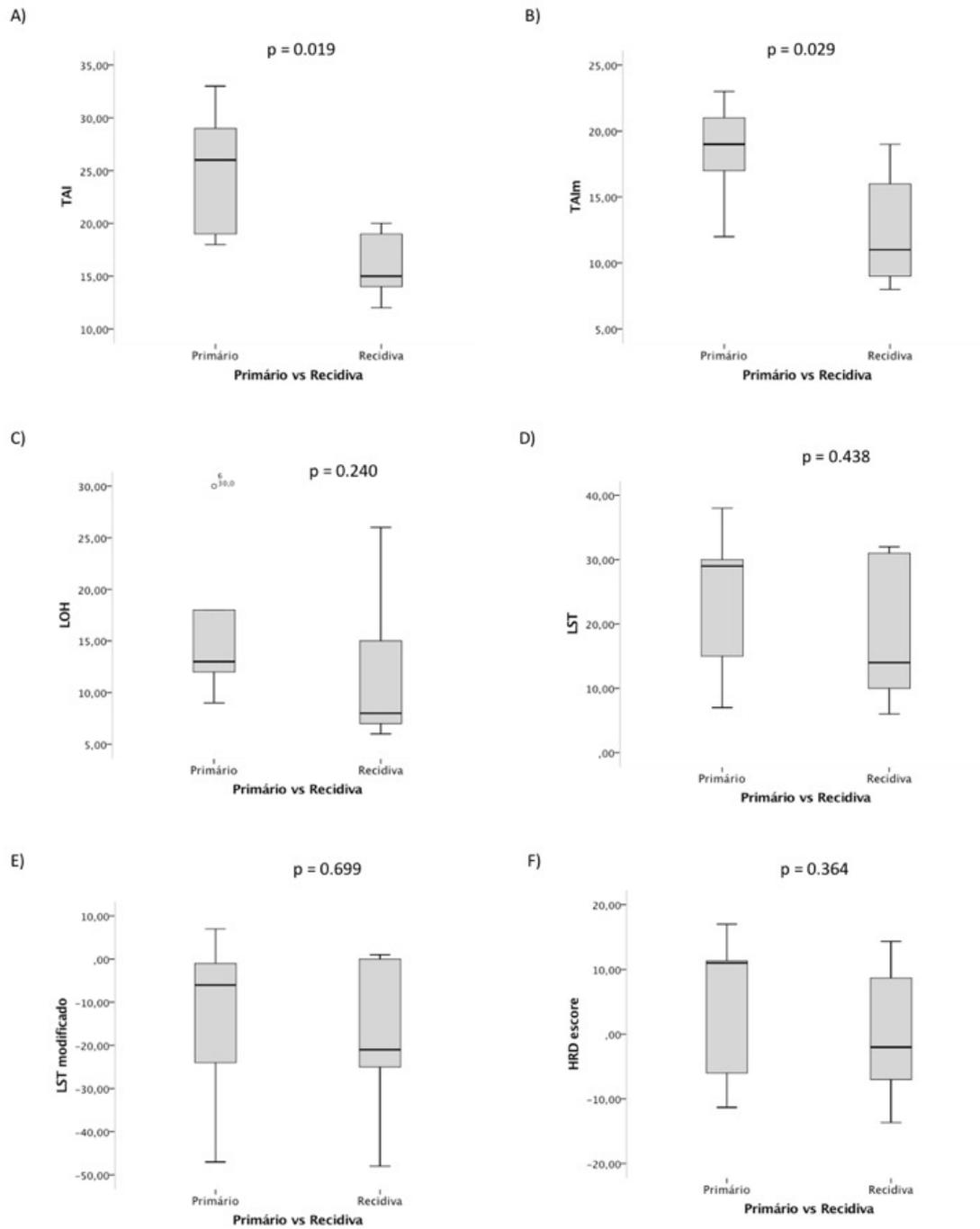


Figura 21 - Distribuição dos escores de deficiência de recombinação homóloga de acordo com o momento de coleta das amostras. (A) TAI, (B) TAlm, (C) cnLOH+L, (D) LST, (E) LSTm e (F) HRD

Da mesma forma, ao categorizar os escores como elevado indicando deficiência da via da recombinação homóloga, ou baixo indicando via da recombinação homóloga preservada, não foi observada diferença estatisticamente significativa (Tabela 15).

Tabela 15 - Pontuação dos escores de deficiência da via da recombinação homóloga de acordo com momento de coleta da amostra de tumor

Escore		Primário	Recidiva	p
TAI	< mediana	3 / 9 (33,3%)	4 / 5 (80,0%)	0,094
	> mediana	6 / 9 (66,7%)	1 / 5 (20,0%)	
TAI modificado	< mediana	3 / 9 (33,3%)	4 / 5 (80,0%)	0,094
	> mediana	6 / 9 (66,7%)	1 / 5 (20,0%)	
cnLOH+L	< 10	1 / 9 (11,1%)	3 / 5 (60,0%)	0,052
	> 10	7 / 9 (88,9%)	2 / 5 (40,0%)	
LST	< 15 se 2N ou < 20 se 4N	2 / 9 (22,2%)	3 / 5 (60,0%)	0,158
	> 15 se 2N ou > 20 se 4N	7 / 9 (77,8%)	2 / 5 (40,0%)	
LST modificado	< mediana	4 / 9 (44,4%)	3 / 5 (60,0%)	0,577
	> mediana	5 / 9 (55,6%)	2 / 5 (40,0%)	
HRD	< mediana	4 / 9 (44,4%)	3 / 5 (60,0%)	0,577
	> mediana	5 / 9 (55,6%)	2 / 5 (40,0%)	

2N = próximo de diploide; 4N = próximo de tetraplóide

A paciente 28 possuía duas amostras de tumor primário coletadas antes de qualquer tratamento, uma proveniente do ovário esquerdo e outra do ovário direito. Ao comparar os escores entre essas duas amostras foi verificada diferença entre as amostras 28A e B. Foram utilizados os limiares adotados na literatura para os escores cnLOH+L de 10 e o escore LST de 15 no caso de tumores quase diplóides e 20 para tumores quase tetraplóides. Essa diferença implica na mudança da classificação do

tumor com deficiência da via da recombinação homóloga (28A) para tumor com via da recombinação homóloga preservada (28B)(Tabela 16).

Tabela 16 – Comparação da pontuação dos escores entre as duas amostras da mesma paciente

Caso / Escore	TAI	TAIm	cnLOH+L	LST	LSTm	HRD
28 A	21	17	7	6	-47	-7,00
28 B	18	16	10	17	-14	4,0

5 DISCUSSÃO

Os carcinomas de ovário são tumores com baixa frequência de mutações recorrentes, com predomínio de mutações em TP53 (> 95% dos carcinomas serosos de alto grau) e mutações em *BRCA1* e *BRCA2* (em torno de 20% a 25% dos casos). São caracterizados por uma alta instabilidade genômica com grande quantidade de alterações do número de cópias e de regiões de perda de heterozigose (TCGA 2011). Um dos principais fatores responsáveis pela instabilidade genômica é a perda de função da via de recombinação homóloga, com uma frequência estimada de 50% dos casos de carcinoma seroso de alto grau de ovário. Esta disfunção pode ocorrer tanto pelas mutações em *BRCA* quanto por alterações de outros genes relacionados diretamente ou indiretamente com a via da recombinação homóloga (TCGA 2011).

Os inibidores de PARP são drogas alvo direcionadas para pacientes portadoras de mutação germinativa ou somática em *BRCA* (FONG et al. 2009; KAYE et al. 2012; LEDERMANN et al. 2012, 2014; LIU et al. 2014; OZA et al. 2015; KAUFMAN et al. 2015; MATULONIS et al. 2016). Nos últimos anos com o desenvolvimento destes inibidores tornou-se de grande importância a identificação das pacientes negativas para a mutação de *BRCA* mas que apresentam disfunção da via da recombinação homóloga por outros mecanismos, as quais são também potenciais candidatas ao tratamento com os inibidores de PARP.

Dentro deste contexto vêm se buscando desenvolver biomarcadores que sejam capazes de detectar a disfunção da via da recombinação homóloga. Entre as várias estratégias descritas em literatura, despontam as cicatrizes genômicas, que são

padrões específicos de alterações de números de cópias genômicas e de perda de heterozigose característicos de disfunção da via da recombinação homóloga (ABKEVICH et al. 2012; BIRKBAK et al. 2012; POPOVA et al. 2012; TIMMS et al. 2014; ISAKOFF et al. 2015; MARQUARD et al. 2015; MCNEISH et al. 2015; TELLI et al. 2015; MANIÉ et al. 2016).

Os estudos publicados em literatura que avaliaram as cicatrizes genômicas utilizaram plataformas diferentes, incluindo SNP arrays e painéis direcionados para SNPs em plataformas de sequenciamento de alto desempenho (NGS). A maioria foi desenvolvida com amostras de pacientes com câncer de mama (POPOVA et al. 2012; TIMMS et al. 2014; ISAKOFF et al. 2015; MARQUARD et al. 2015; TELLI et al. 2015; MANIÉ et al. 2016) . Um menor número de relatos investigou casos com câncer de ovário (ABKEVICH et al. 2012; BIRKBAK et al. 2012; MCNEISH et al. 2015).

No presente estudo, utilizamos o SNP array Affymetrix® OncoScan Assay para caracterizar amostras de carcinomas de ovário de acordo com escores relacionados à deficiência da via da recombinação homóloga. Foi avaliada a associação desses escores com a resposta à quimioterapia com platina em um contexto onde a taxa de resposta esperada seria baixa. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi identificar pacientes com taxa de resposta alta em um grupo de pacientes com taxa de resposta esperada baixa para quimioterapia. Este é um aspecto clínico característico de pacientes com deficiência da via da recombinação homóloga (TAN e KAYE 2015).

Entre as 27 amostras selecionadas com tecido disponível para a extração de DNA, 15 casos foram efetivamente analisados. Entre os fatores que contribuíram

para a falha dos experimentos encontra-se a dificuldade na obtenção de DNA de qualidade e quantidade satisfatórias utilizando tecidos fixados e em blocos de parafina. Em muitos casos, a quantidade de tumor era restrita em meio ao tecido normal, o que dificultava a sua obtenção.

Os principais métodos para avaliação de alterações do número de cópias e regiões cnLOH do genoma inteiro são as plataformas de SNP array e de NGS. Em relação aos SNP arrays, o NGS tem a potencial vantagem de fornecer também dados de sequenciamento identificando mutações, mas também permitindo a avaliação dos pontos de quebra das alterações estruturais em nível de um par de base. Porém, a determinação do número de cópias por NGS ainda tem muitos desafios na análise devido a variabilidade de cobertura de cada região na dependência da frequência de repetições GC e o seu mapeamento na região (POPOVA et al. 2013a). Os SNP arrays permitem abordar de maneira direta as alterações estruturais fornecendo os dados de número de cópias em cada SNP bem como a frequência de cada alelo (chamada de frequência do alelo B). A vantagem deste método em comparação com o array CGH é a possibilidade de avaliar a porcentagem de células da amostra que carregam a alteração (POPOVA et al. 2013a). Entre os SNP arrays a plataforma ONCOSCAN utiliza a tecnologia de molecular inversion probe (MIP) que necessita de uma sequência alvo de DNA intacta de 40bp permitindo a utilização de material em parafina que apresenta DNA fragmentado. Além disso, possui uma resolução elevada de 50-100 Kb para as regiões de 900 oncogenes e genes supressores tumorais e permite a detecção de 74 mutações patogênicas conhecidas em 9 genes frequentemente alterados em neoplasias malignas (FOSTER et al. 2015). Em adição a estes fatores, amostras fixadas em formalina e em blocos de parafina tem

limitações importantes para serem utilizadas em experimentos de NGS e os protocolos de análise não são bem estabelecidos para alterações no número de cópias. Nós utilizamos a plataforma ONCOSCAN (Affymetrix) para avaliar amostras de carcinomas de ovário fixadas em formalina e em blocos de parafina com idade entre 5 e 10 anos. Entre as amostras com quantidade suficiente de DNA para proceder o ensaio, três das 18 testadas não apresentaram qualidade suficiente para permitir as análises.

A análise dos dados genômicos revelou, na maioria dos casos, o padrão esperado de grande instabilidade genômica com diversas regiões de ganhos e perdas do genoma e de cnLOH. Os cromossomos 17, 22 e 13 foram os mais frequentemente envolvidos, sendo que o cromossomo 17 apresentou perda de heterozigose do cromossomo inteiro ou da sua maior parte em todos os casos.

A análise de 532 pacientes do banco de dados do TCGA mostrou que os cromossomos 17 e 13 são os mais frequentemente afetados por perda de heterozigose. A frequência de perda de heterozigose foi de 76,7% em 17q, 39,7% em 17p e 38,2% em 13q. Neste mesmo estudo as pacientes com perda de heterozigose de todo o cromossomo 17 apresentaram pior sobrevida global quando comparadas com as demais pacientes (TUNA et al. 2015). O gene *TP53* mapeado em 17p13.1 apresenta mutação em 96% dos tumores (TCGA 2011) e a perda de heterozigose pode ser um mecanismo que leve a perda do alelo não mutado contribuindo para a carcinogênese relacionada à perda da função deste supressor tumoral. No mesmo estudo de Tuna et al (2015), foi demonstrada uma associação entre mutação no *TP53* e perda de heterozigose da região 17p13.1 (TUNA M et al 2015).

A pesquisa de 74 mutações em nove genes mostrou dois casos com mutações

em *TP53* e dois casos com mutações em *NRAS*. Um dos casos com mutação em *TP53* apresentava também mutação *PTEN*. Mutações em *TP53* são as mais frequentes em pacientes com carcinoma seroso de alto grau, com frequência de 96% nas pacientes do TCGA (TCGA 2011). A baixa frequência de mutações na nossa amostra se deve à metodologia utilizada uma vez que a plataforma ONCOSCAN é capaz de genotipar 19 variantes dentre as inúmeras conhecidas no gene *TP53* (FREED-PASTOR e PRIVES 2012).

As mutações inativadoras em *PTEN* são um evento esperado em aproximadamente 1% dos casos de carcinoma seroso de ovário (TCGA 211). A paciente 10 apresentou a variante p.R130*, c.388C>T, uma variante no éxon 5 que leva a um códon de parada. Esta variante corresponde a aproximadamente 7% das mutações somáticas em *PTEN* descritas nos tumores epiteliais de ovário, incluindo histologias diferentes dos carcinomas serosos de alto grau (KHABELE 2015). Nesse mesmo caso da paciente 10 do estudo atual a região do cromossomo 10 onde se localiza o gene *PTEN* apresenta também uma perda do número de cópias com um valor de número de cópias médio da região de 1,67. O papel do *PTEN* na carcinogênese do câncer de ovário e sua consequência na sensibilidade do tumor ao tratamento é controverso. A proteína *PTEN* participa da via PI3K-Akt-mTOR, importante na indução de apoptose induzida pela cisplatina. Desta forma esperar-se-ia que a perda da função de *PTEN* induzisse resistência à quimioterapia. Ao menos um estudo encontrou mutação em *PTEN* em tumores refratários ao tratamento com platina (PATCH et al. 2015) e outro encontrou uma frequência alta de deleções de *PTEN* chegando a 50% dos casos com perda de expressão e implicada em um pior prognóstico (MARTINS et al. 2014). Em contrapartida a perda de *PTEN* pode estar

relacionada também a deficiência da via da recombinação homóloga o que implicaria sensibilidade aos inibidores de PARP e maior sensibilidade à quimioterapia baseada em platina (MCELLIN 2010; TCGA 2011). A paciente do nosso estudo apresentou escore de *cnLOH+L* de 26 (segundo mais alto da coorte), e escore de *LST* de 27,0. Portanto, esta paciente é definida pelos dois escores como tendo deficiência da via da recombinação homóloga, e apresentou resposta parcial ao tratamento de reexposição à platina. Estes resultados sugerem a presença de deficiência de recombinação homólogo no tumor e maior sensibilidade ao tratamento, ainda que uma associação definitiva não possa ser estabelecida entre as alterações em *PTEN* e essas características descritas a partir de um único caso.

Os genes *PTEN* e *TP53* estão relacionados às síndromes hereditárias de Cowden e Li Fraumeni, respectivamente (MCBRIDE et al. 2014, NGEOW et al. 2015). Porém, estas síndromes não estão associadas classicamente a um maior risco de câncer de ovário e nos casos 10 e 16 no presente estudo não havia história familiar sugestiva de Síndrome de Cowden ou Síndrome de Li Fraumeni.

Dois casos apresentaram mutação em *NRAS*. As mutações em *NRAS* são eventos raros nos carcinomas serosos de ovário, porém foram também detectadas no estudo do TCGA sendo consideradas mutações patogênicas pelo ClinVar. Estas alterações são potencialmente relevantes em carcinomas serosos de alto grau de ovário (TCGA 2011). O achado dessas mutações em dois casos da nossa amostra corrobora a possível participação destas mutações na carcinogênese do carcinoma seroso de alto grau de ovário.

O escore HRD-TAI mostrou uma mediana de 19,5, sendo 19,0 nas pacientes respondedoras e 24,0 nas pacientes não respondedoras ($p = 0,710$). No estudo que

descreveu inicialmente o escore TAI (BIRBAK et al. 2012) a mediana do escore na coorte de pacientes com carcinoma seroso de ovário sem mutação de *BRCA* foi de 22,0 versus 20,0 ($p = 0,036$) nos tumores considerados sensíveis à platina comparado com os tumores considerados resistentes à platina na primeira linha de tratamento pós cirurgia. No grupo de pacientes com mutação de *BRCA* foi de 26,0 versus 23,5 ($p = 0,037$) nos tumores sensíveis comparado aos tumores resistentes. Em um segundo estudo avaliando o mesmo escore em múltiplos tumores primários a coorte de carcinomas serosos de ovário apresentou escore mediano de 24,0 (MARQUARD et al. 2015). Dessa forma os valores encontrados na nossa coorte foram próximos do esperado para uma coorte de pacientes com carcinoma seroso de ovário.

O escore *cnLOH+L* apresentou uma mediana de 12,5, sendo observado o escore de 13,0 nas respondedoras e 12,0 nas não respondedoras ($p = 0,535$). O estudo inicial que descreveu o escore *cnLOH+L* avaliou o escore em uma coorte de pacientes com carcinoma seroso de alto grau de ovário e testou a correlação do escore com a presença de mutação de *BRCA1* ou *BRCA2* e encontrou uma mediana de 15,5 vs 8,5 para pacientes com mutação comparado às pacientes sem mutação em *BRCA* (ABKEVICH et al. 2012). Um segundo estudo avaliando vários tumores primários encontrou uma mediana de 15,0 para o escore *cnLOH+L* na coorte de pacientes com carcinoma seroso de alto grau de ovário (MARQUARD et al. 2015). Desta forma os resultados encontrados na nossa coorte com um valor elevado para o escore *cnLOH+L* com mediana acima de 10, estão de acordo com os resultados encontrados na literatura para pacientes com carcinoma seroso de ovário, ainda que não possamos avaliar os valores dos escores de acordo com o status de mutação de *BRCA* no presente estudo.

O escore LST mostrou uma mediana de 26,0, sendo 28,0 nas respondedoras e 18,0 nas não respondedoras ao tratamento ($p = 0,259$). O grupo francês que desenvolveu o escore LST em seus dois trabalhos avaliou apenas tumores de mama (POPOVA et al. 2012; MANIÉ et al. 2016). Um terceiro estudo avaliou coortes de 15 tumores de sítios primários distintos incluindo uma coorte de carcinoma seroso de alto grau de ovário (MARQUARD et al. 2015). Os autores encontraram uma mediana de 20,0 para o escore LST na coorte de pacientes com carcinoma de ovário que foi o sítio primário com a maior pontuação seguido por carcinoma de células escamosas de pulmão com mediana de 13 e carcinoma urotelial de bexiga com mediana de 11 e adenocarcinoma de pulmão com mediana de 10. Assim como para o escore $cnLOH+L$, os resultados encontrados na nossa coorte estão de acordo com os descritos em literatura corroborando um valor elevado para o escore LST em pacientes com carcinoma seroso de ovário.

Os escores $cnLOH+L$ e LST tem limiar estabelecido em literatura. ABKEVICH et al. (2012) determinaram o limiar do escore $cnLOH+L$ como 10 de forma que 90% das pacientes com câncer de mama e ovário e mutação em *BRCA* apresentavam valores de escore igual ou superior a 10 (ABKEVICH et al 2012). O limiar do escore LST descrito por POPOVA et al (2012) foi baseado na ploidia em uma coorte de pacientes com tumores de mama apresentando deficiência na via da recombinação homóloga. No grupo de tumores quase diploides foi considerado $LST > 15$ e no grupo de tumores tetraploides com $LST > 20$. Estes limiares mostraram sensibilidade de 100% e especificidade em torno de 60% na coorte original e na coorte de validação de pacientes com câncer de mama triplo negativos. Para determinação da sensibilidade e especificidade deste limiar foi utilizado apenas a

presença de mutações de *BRCA1* ou *BRCA2* como padrão ouro para definir deficiência da via da recombinação homóloga sem considerar outras alterações da via da recombinação homóloga (POPOVA et al. 2012). Levando-se em conta esses limiares previamente definidos em literatura, encontramos 10 pacientes (70%) pelo escore cnLOH+L e 9 pacientes (65%) pelo escore LST, de um total de 14 pacientes, com tumores com escores altos sugerindo a presença da deficiência da via da recombinação homóloga.

Em uma população não selecionada, espera-se que 51% dos tumores de ovário apresentem deficiência da via da recombinação homóloga (KONSTANTINOPOULOS et al. 2015). No presente estudo, o número de pacientes com deficiência da via da recombinação homóloga foi acima do esperado. Uma provável explicação para a elevada prevalência de deficiência da via da recombinação homóloga no estudo atual é um viés de seleção. Nós utilizamos como critério de inclusão pacientes reexpostas à platina em um cenário onde esse não é o tratamento padrão. Esse critério de inclusão pode ter resultado em uma seleção de um grupo de pacientes mais sensível à quimioterapia que sobreviveram após vários tratamentos prévios e, portanto, chegaram a ter necessidade de serem reexpostas a platina. De fato, 45,2% das pacientes recebeu quatro ou mais linhas de tratamento previamente à reexposição à platina. Além disso nove das 31 pacientes tinham história familiar para câncer de mama ou ovário e a idade mediana da coorte de 56,6 anos foi um pouco abaixo da idade mediana de diagnóstico da população geral (~ 63 anos). Estes dados sugerem que a população deste estudo está enriquecida com pacientes com maior sensibilidade ao tratamento, possivelmente por apresentarem mutação em *BRCA*. Entretanto, isso ainda não pode ser comprovado pois não foi

realizada esta investigação no presente estudo. Ao menos um estudo corrobora essa hipótese mostrando que pacientes respondedoras a múltiplas linhas de tratamento tem uma chance maior de serem portadoras de mutação *BRCA*, seja ela germinativa ou somática (ALSOP et al. 2012). Alsop et al avaliaram uma coorte de 1000 pacientes com câncer de ovário quanto a presença de mutações em *BRCA* e resposta a múltiplas linhas de tratamento. Vinte e dois por cento das pacientes com mutação germinativa foram tratadas com múltiplas linhas de tratamento enquanto 14% das pacientes sem mutação foram tratadas com múltiplas linhas de tratamento. Das pacientes sem mutação germinativa que continuaram a apresentar resposta após a terceira linha de tratamento com platina 25% apresentava mutação somática de *BRCA1* ou *BRCA2*, mostrando uma frequência bem acima dos 3 a 5% esperado em uma população não selecionada com carcinoma de ovário.

Para definição de deficiência da via de recombinação homóloga de forma dicotômica os escores *cnLOH+L* e *LST* mostraram uma concordância excelente com o índice kappa de 0,837. Quando considerados como variáveis contínuas, foi forte a correlação entre os escores *cnLOH+L* e *LST* ($\rho = 0,79$) e moderada entre os escores *TAI* e *cnLOH+L* ($\rho = 0,63$) e *TAI* e *LST* ($\rho = 0,64$). Não avaliamos a correlação entre o escore *HRD* e os demais escores pois este é derivado diretamente dos escores originais sendo uma medida sintética desses três escores.

ISAKOFF et al. (2015) avaliaram os escores *cnLHO+L* e *LST* em um estudo de fase II com pacientes com câncer de mama triplo negativo tratadas com platina em primeira linha de doença metastática e encontraram uma correlação significativa entre os dois escores ($p = 0,0035$, coeficiente de correlação não descrito). Em 2014, TIMMS et al. (2014) avaliaram a correlação entre os três escores em uma coorte de

250 pacientes com câncer de mama triplo negativo e mostraram uma correlação forte entre TAI e cnLOH+L ($\rho = 0,78$) e moderada entre TAI e LST ($\rho = 0,65$) e LST e cnLOH+L ($\rho = 0,72$).

A correlação entre os três escores foi também avaliada em um total de 5371 amostras de tumores provenientes de 15 sítios primários distintos, incluindo câncer de ovário, e foi encontrada uma correlação forte entre TAI e LST ($\rho = 0,87$) e TAI e cnLOH+L ($\rho = 0,81$), e moderada entre cnLOH+L e LST ($\rho = 0,73$). Especificamente na coorte de pacientes com câncer de ovário apenas os escores TAI e LST apresentaram correlação moderada entre com ρ entre 0,5 e 0,75, enquanto a correlação entre TAI e cnLOH+L e entre LST e cnLOH+L foi regular com ρ entre 0,25 e 0,5 (MARQUARD et al. 2015).

O presente estudo demonstra uma correlação moderada entre os escores para as pacientes com câncer de ováriosugerindo que os três mensuram o mesmo fenômeno, a deficiência da via da recombinação homóloga. Embora todos identifiquem a mesma consequência final de deficiência da via da recombinação homóloga, cada escore mede eventos distintos. Essa hipótese é sustentada pelo achado de MARQUAD et al. (2015) que mostraram que apenas 3,1% dos eventos de alterações estruturais foi contabilizado pelos três escores e que em torno de 11% dos eventos de alterações estruturais foi contabilizado por ao menos dois escores (MARQUARD et al. 2015).

A taxa de resposta à quimioterapia no cenário platina resistente é entre 10% e 20% (COLOMBO et al. 2014; PUJADE-LAURINE et al. 2014). A taxa de resposta encontrada para a coorte de 31 pacientes foi acima da esperada para casos com recidiva platina resistente (16 casos, 51,6%). Da mesma forma no subgrupo das 14

pacientes submetidas ao ensaio ONCOSCAN a taxa de resposta foi acima da esperada, 7 de 14 pacientes (50,0%).

A taxa de resposta elevada poderia ser atribuída à falha de avaliação por se tratar de estudo retrospectivo. Essa questão foi abordada realizando uma revisão da resposta ao tratamento das pacientes utilizando-se critérios bem estabelecidos em estudos clínicos. Ainda assim, quatro pacientes não tiveram confirmação de resposta ao tratamento por uma terceira medida de CA125 e duas pacientes não possuíam exames de imagem ou do marcador tumoral e tiveram avaliação de resposta baseada na avaliação clínica. Porém, dessas seis pacientes três que apresentavam apenas duas medidas do CA125 apresentaram progressão da doença e as duas pacientes que apresentavam apenas a avaliação clínica reportada também apresentaram progressão de doença. Dessa forma, dentre os casos revisados que foram considerados como “resposta ao tratamento” todos preenchiam os critérios de resposta de acordo com GCIG (RUSTIN et al. 2004). Outro fator relacionado à elevada resposta poderia ser atribuído ao uso de combinação de quimioterápicos em todas, exceto uma paciente. Contudo, estudos prévios indicam não haver benefício associado à evolução da doença quando utilizadas combinações de tratamento (LORTHOLARY et al. 2012). O segundo agente em combinação com a platina era, na maioria das vezes, uma droga ativa no cenário platina resistente, porém a taxa de resposta esperada para essas drogas em monoterapia não seria dessa magnitude próxima dos 50% (GORDON et al. 2001; MUTCH et al. 2007).

Afastando um viés de mensuração e a utilização do tratamento não convencional de quimioterapia em combinação utilizado, se fortalece a hipótese de um fator intrínseco aos tumores para justificar a alta taxa de resposta ao tratamento

de reexposição à platina das pacientes do nosso estudo. A elevada frequência de deficiência da via da recombinação homóloga (10 de 14 pacientes) encontrada corrobora esta hipótese.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre as taxas de resposta das pacientes de acordo com o valor dos escores. Entretanto, 6 de 10 (60%) pacientes com escore cnLOH+L elevado e apenas 1 de 4 (25%) pacientes com escore cnLOH+L baixo apresentaram resposta favorável ao tratamento. Em adição, 6 de 9 pacientes (66%) com escore LST elevado e apenas 1 de 5 (20%) pacientes com escore LST baixo apresentaram resposta ao tratamento. Numericamente os escores cnLOH+L, LST e HRD foram mais altos nas pacientes que responderam ao tratamento quando comparados com os escores das pacientes que não responderam, embora essa diferença também não tenha se mostrado estatisticamente significativa. O escore TAI e TAI_m foram os únicos que mostraram distribuição no sentido oposto, ou seja, escores mais altos nas pacientes que não responderam ao tratamento.

Dentre os estudos prévios de desenvolvimento dos escores marcadores de deficiência de recombinação homóloga apenas três estudos em pacientes com câncer de ovário testaram a associação entre escores elevados desfechos clínicos relacionados ao tratamento com platinas, dois deles avaliaram sobrevida global e sobrevida livre de progressão (ABKEVICH et al. 2012, BIRKBAK et al. 2012) e apenas um avaliou a associação com taxa de resposta ao tratamento baseado em platina (BROWN et al 2015).

O escore cnLOH-L foi estudado inicialmente em uma coorte de pacientes com câncer de ovário e sua associação com a presença de mutação em *BRCA1* e *BRCA2* ou metilação do promotor do *BRCA1*. Não foi observada associação

significativa entre a sobrevida global e sobrevida livre de progressão. Esse estudo não avaliou a associação da resposta ao tratamento (ABKEVICH et al. 2012). A associação entre o escore cnLOH-L e resposta ao tratamento com platina foi demonstrada em outros dois estudos com o escore cnLOH-L (TELLI et al. 2015; ISAKOFF et al. 2015). Estes estudos, porém, avaliaram uma população de pacientes com câncer de mama triplo negativo em quimioterapia neoadjuvante e mostraram uma maior taxa de resposta ao tratamento em pacientes com escore cnLOH-L mais elevados, inclusive dentro do grupo de pacientes com sem mutação em *BRCA1* ou *BRCA2* (TELLI et al. 2015; ISAKOFF et al. 2015).

O escore LST foi avaliado de forma isolada exclusivamente em pacientes com câncer de mama (POPOVA et al. 2012, ISAKOFF et al. 2015, MANIÉ T et al. 2016). Dois estudos mostraram sua associação com a presença de mutação em *BRCA1* ou *BRCA2* ou metilação do promotor do *BRCA1* nos quais não houve avaliação da associação do escore com resposta (POPOVA et al. 2012; MANIÉ et al. 2016). Um terceiro estudo avaliou a associação entre o escore LST e resposta ao tratamento com quimioterapia neoadjuvante baseada em platina em pacientes com câncer de mama triplo negativo e mostrou uma maior resposta para as pacientes com escores mais elevados (ISAKOFF et al. 2015).

O escore TAI foi estudado de forma isolada em apenas um estudo incluindo tanto pacientes com câncer de mama quanto câncer de ovário. (BIRKBAK et al. 2012). Os autores relataram a associação entre escores elevados e doença platina sensível definida como tempo de intervalo entre o término do tratamento adjuvante e a primeira recidiva maior que seis meses. Por se tratar de tratamento adjuvante não foi realizada a avaliação de resposta.

Os estudos do escore HRD combinando os escores TAI_m, LST_m, cnLOH+L foram descritos para pacientes com câncer de mama. Em um deles, TIMMS et al (2014) mostraram sua associação com a mutação em *BRCA1* ou *BRCA2* ou metilação do promotor do *BRCA1* mas não avaliaram a resposta ao tratamento. Em um estudo recente, TELLI et al (2016) avaliaram a associação do escore HRD com resposta à quimioterapia neoadjuvante baseada em platina em pacientes com câncer de mama triplo negativo. Neste estudo, numa fase inicial de desenvolvimento do escore havia pacientes com câncer de ovário nos quais se mostrou a associação do escore elevado com a presença de mutação em *BRCA1* ou *BRCA2*, porém não houve avaliação de resposta dessas pacientes (TELLI et al. 2016).

Em pacientes com câncer de ovário os estudos priorizaram e demonstraram a associação dos escores de deficiência da via da recombinação homóloga com a resposta a inibidores de PARP (HODGSON et al. 2015; MCNEISH et al. 2015). O único estudo a testar a associação entre a resposta ao tratamento com quimioterapia baseado em platina e um escore de deficiência da via da recombinação homóloga foi o estudo de BROWN et al. (2015). Os autores selecionaram uma coorte de 109 pacientes com carcinoma de ovário seroso de alto grau que apresentavam CA125 elevado após a cirurgia provenientes de um estudo de fase II e que foram submetidos a tratamento adjuvante com monoterapia com platina. Foi verificada uma associação entre escores HRD elevados e diminuição do CA125 após o tratamento adjuvante (BROWN et al. 2015). Apesar de avaliar um cenário de tratamento diferente do presente estudo feito com pacientes no cenário de doença platina resistente e utilizar exclusivamente o CA125 para avaliação de resposta as conclusões dos dois trabalhos são semelhantes, ou seja, escores de deficiência da via da recombinação homóloga

elevados identificam pacientes com maior sensibilidade à platina.

O presente estudo é um dos primeiros a fazer uma avaliação direta da associação entre resposta ao tratamento com platina e os escores de deficiência da via de recombinação homóloga em pacientes com carcinoma de ovário, e, para o nosso conhecimento, é o único a avaliar a associação destes escores com resposta a reexposição à platina no cenário de doença platina resistente. Os achados do presente estudo corroboram a hipótese de uma resposta mais favorável ao tratamento para as pacientes com tumores com elevados escores de deficiência da via da recombinação homóloga mesmo nesse cenário de pacientes tratadas com múltiplas linhas de quimioterapia prévia

Esses achados ampliam o debate da definição da recidiva dos carcinomas de ovário como doença sensível ou resistente à platina baseado unicamente no critério intervalo livre de platina (ALVAREZ et al. 2016). Além disso, mostram a importância das características biológicas do tumor e identificação de biomarcadores para a tomada de decisão de tratamento não só no que diz respeito às terapias alvo mas também para os agentes quimioterápicos tradicionais como no caso as platinas.

Na presente casuística, a sobrevida global mediana foi 13,4 meses desde o início do tratamento de reexposição à platina e não houve diferença de acordo com os valores dos escores. Porém, o número de pacientes limita o poder estatístico deste tipo de análise. Dois estudos prévios avaliaram o impacto dos escores de deficiência da recombinação homóloga na sobrevida (BIRKBAK et al. 2012; BROWN et al. 2015). BIRKBAK et al. (2012) não conseguiram mostrar uma associação entre o escore TAI elevado e a sobrevida global de pacientes com câncer de ovário. Em oposição, BROWN et al. (2015) mostraram uma maior sobrevida global para

pacientes com o escore HRD elevado.

No nosso estudo o escore TAI mostrou uma distribuição no sentido oposto do esperado com valores mais altos no grupo de pacientes que não responderam ao tratamento e uma sobrevida global menor para as pacientes com escores mais elevados embora nenhuma das diferenças tenha sido estatisticamente significativa. O escore TAI se mostrou também associado a idade maior que 65 anos e a um intervalo livre de platina menor que 12 meses antecedendo o tratamento estudado (Figuras 14 e 15). Estes podem ser fatores de confusão que em uma população pequena podem ter contribuído para os resultados com sinais divergentes do TAI em relação aos outros escores quanto à resposta ao tratamento e sobrevida.

O único fator clínico associado com uma maior taxa de resposta foi a história familiar positiva para câncer de mama ou ovário ou uma história pessoal de câncer de mama. Uma limitação do nosso estudo é a ausência das informações sobre o padrão de mutação germinativa dos genes *BRCA1* e *BRCA2*. As pacientes com carcinoma de ovário apresentam um risco em torno de 15% de serem portadoras de mutações germinativas de *BRCA1* ou *BRCA2*, independente da história familiar (RISCH et al. 2001). Fizemos uma simulação de uma paciente com carcinoma de ovário com histórico familiar fraco, por exemplo, uma tia ou prima com câncer de mama em idade superior a 60 anos, usando o modelo de risco PENN II (www.afcri.upenn.edu/itacc/penn2) e verificamos que uma paciente com essas características teria um risco de 25% de ser portadora de mutação de *BRCA*. Qualquer outro histórico familiar considerado no nosso estudo eleva o risco de ser portadora em um valor maior que esse aqui descrito. Além de *BRCA1* e *BRCA2* outros genes de predisposição hereditária ao câncer de ovário também podem estar

associados à deficiência da via da recombinação homóloga como é o caso do *RAD51C* e *RAD51C* (NORQUIST et al. 2016). Entre as nove pacientes com história familiar positiva, seis foram testadas pela plataforma OncoScan. Destas, quatro apresentaram escore de cnLOH+L maior que 10 e também um escore de LST acima do limiar para ser considerado como deficiente para via da recombinação homóloga. Desta forma o achado de maior resposta na reexposição à platina das pacientes com histórico familiar positivo coincide com pelo menos um relato da literatura (ALSOP et al. 2012). Esses dados apoiam a hipótese de se reconsiderar a definição de doença platina resistente baseada apenas no tempo de intervalo do último tratamento utilizando platina sem levar em conta os aspectos moleculares da doença (ALVAREZ et al. 2016).

Entre as 15 amostras, 10 eram provenientes de tumores primários sem tratamento e cinco de tumores no momento da recidiva após tratamento quimioterápico. O tratamento quimioterápico potencialmente pode induzir a formação de novas alterações genômicas estruturais que comprometam a avaliação do tumor pelos escores de via da recombinação homóloga no tumor coletado após a quimioterapia. Por outro lado, ao longo da evolução do tumor, outras alterações, como por exemplo mutações secundárias do *BRCA*, poderiam recompor a função da via da recombinação homóloga comprometendo o valor de um escore realizado no tumor primário para uma decisão de tratamento na recidiva, pois um escore no tumor primário apontando deficiência da via da recombinação homóloga pode não corresponder ao real status da via após as alterações secundárias citadas (BARBER et al. 2013; YAMAMOTO et al. 2014).

No presente estudo, os perfis de alterações genômicas estruturais foram

semelhantes entre os tumores primários e recidivados (Figura 12), porém foi observada uma distribuição desigual dos valores dos escores TAI e TAI_m entre tumores primários e tumores recidivados. Para os outros escores apesar de não haver diferença estatisticamente significativa, a distribuição manteve o mesmo padrão de valores maiores para tumores primários e menores para tumores recidivados (figura 20). Para o nosso conhecimento, um único estudo em literatura fez essa avaliação em 25 amostras pareadas de tumores primários e recidivados após tratamento quimioterápico (PATEL et al. 2015). Apesar de serem detectadas diferenças nos perfis de alterações estruturais genômicas globais entre os tumores, os autores não detectaram diferença no escore HRD entre os tumores primários e recidivados (coeficiente de correlação de Pearson de 0,953) (PATEL et al. 2015). Em nosso estudo, as amostras não foram pareadas não permitindo chegar a uma conclusão sobre a adequação do material no momento da recidiva para avaliar os escores da via da recombinação homóloga.

Duas amostras do tumor primário da paciente 28 do nosso estudo foram avaliadas, uma do ovário esquerdo e a outra do ovário direito. Os perfis de alterações estruturais genômicas globais apresentavam diferenças em 7 segmentos com regiões de ganhos e de cnLOH diferentes entre as duas amostras nesses segmentos (Figura 11). Os escores de deficiência da via da recombinação homóloga também se mostraram diferentes entre as amostras. (Tabela 18). Um estudo com 33 pacientes com câncer de mama avaliou o escore HRD em três amostras de biópsias distintas de cada tumor coletadas em um mesmo momento e mostrou uma correlação excelente entre os escores com um coeficiente de correlação de 0,977.

6 CONCLUSÃO

- Este estudo demonstrou ser factível a avaliação das cicatrizes genômicas usando a análise do padrão de alteração do número de cópias e de cnLOH de todo o genoma. Esta análise permitiu classificar dos tumores de acordo com escores de deficiência da via da recombinação homóloga a partir de material arquivado em parafina há mais de cinco anos.
- Foi verificado que o carcinoma de ovário é uma neoplasia caracterizada por uma alta instabilidade genética com alterações de número de cópias genômicas e cnLOH.
- Embora com um pequeno número de sondas capazes de identificar mutações, a plataforma usada permitiu a identificação da mutação em TP53 em 2 casos.
- Um caso apresentou mutação no gene PTEN (exon 5) e também uma perda genômica envolvendo a região de PTEN. Esta paciente apresentava escores de deficiência da via da recombinação elevados.
- Os carcinomas de ovário apresentam escores de alteração da via da recombinação homóloga elevado indicando uma alta frequência de deficiência desta via de reparo.
- Pacientes com resposta prévia a múltiplas linhas de tratamento quimioterápico apresentaram sensibilidade elevada à reexposição de platina como parte de seu esquema quimioterápico.
- Os dados deste estudo sugerem uma associação entre escores de deficiência da via da recombinação homóloga elevados e resposta ao tratamento de

reexposição platina no cenário de tratamento de uma recidiva platina resistente. A associação não se mostrou estatisticamente significativa possivelmente pelo número reduzido de pacientes avaliados.

- A história familiar de câncer de mama ou ovário e história pessoal de câncer de mama são fatores associados a uma maior taxa de resposta ao tratamento de reexposição platina no cenário de tratamento de uma recidiva platina resistente.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abkevich V, Timms KM, Hennessy BT, et al. Patterns of genomic loss of heterozygosity predict homologous recombination repair defects in epithelial ovarian cancer. **Br J Cancer** 2012; 107:1776-82

Aghajanian C, Blank SV, Goff BA, et al. OCEANS: A randomized, double-blind, placebo-controlled phase III trial of chemotherapy with or without bevacizumab in patients with platinum-sensitive recurrent epithelial ovarian, primary peritoneal, or fallopian tube cancer. **J Clin Oncol** 2012; 30:2039-45.

Aghajanian C, Goff B, Nycum LR, Wang YV, Husain A, Blank SV. Final overall survival and safety analysis of OCEANS, a phase 3 trial of chemotherapy with or without bevacizumab in patients with platinum-sensitive recurrent ovarian cancer. **Gynecol Oncol** 2015; 139:10-6.

Al Rawahi T, Lopes AD, Bristow RE, et al. Surgical cytoreduction for recurrent epithelial ovarian cancer. **Cochrane Database Syst Rev** 2013; 2:CD008765.

Alberts DS, Liu PY, Hannigan EV, et al. Intraperitoneal cisplatin plus intravenous cyclophosphamide versus intravenous cisplatin plus intravenous cyclophosphamide for stage III ovarian cancer. **N Engl J Med** 1996; 335:1950-5.

Alsop K, Fereday S, Meldrum C, et al. BRCA mutation frequency and patterns of treatment response in BRCA mutation-positive women with ovarian cancer: a report from the Australian Ovarian Cancer Study Group. **J Clin Oncol** 2012; 30:2654-63.

Alvarez RD, Matulonis UA, Herzog TJ, Coleman RL, Monk BJ, Markman M. Moving beyond the platinum sensitive/resistant paradigm for patients with recurrent ovarian cancer. **Gynecol Oncol** 2016; 141:405-9.

Armstrong DK, Bundy B, Wenzel L, et al. Intraperitoneal cisplatin and paclitaxel in ovarian cancer. **N Engl J Med** 2006; 354:34-43.

Balmaña J, Díez O, Castiglione M. ESMO Guidelines Working Group. BRCA in breast cancer: ESMO clinical recommendations. **Ann Oncol** 2009; 20 Suppl 4:19-20.

Barber LJ, Sandhu S, Chen L et al. Secondary mutations in BRCA2 associated with clinical resistance to a PARP inhibitor. **J Pathol** 2013; 229:422-9.

Birkbak NJ, Wang ZC, Kim JY, et al. Telomeric allelic imbalance indicates defective DNA repair and sensitivity to DNA-damaging agents. **Cancer Discov** 2012; 2:366-75.

Bolton KL, Chenevix-Trench G, Goh C, et al. EMBRACE; kConFab Investigators; Cancer Genome Atlas Research Network. Association between BRCA1 and BRCA2 mutations and survival in women with invasive epithelial ovarian cancer. **JAMA** 2012; 307:382-90.

Brown R, Timms K, Paul J, et al. Homologous recombination (HR) deficiency, tumor BRCA1/2 mutations (tmBRCA) and association with response and outcome following platinum monotherapy in high grade serous ovarian cancer (HGSOC). **J Clin Oncol** 2015; 33suppl; abstr 5576. [Presented at 2015 ASCO Annual Meeting; 2015 May 29-Jun 2; Chicago].

Burger RA, Brady MF, Bookman MA, et al. Incorporation of bevacizumab in the primary treatment of ovarian cancer. **N Engl J Med** 2011; 365:2473-83.

Caestecker KW, Van de Walle GR. The role of BRCA1 in DNA double-strand repair: past and present. **Exp Cell Res** 2013; 319:575-87.

Cannistra SA. Cancer of the ovary. **N Engl J Med** 2004; 351:2519-29.

Carsen JE, Quinn JE, Michie CO, et al. BRCA1 is both a prognostic and predictive biomarker of response to chemotherapy in sporadic epithelial ovarian cancer. **Gynecol Oncol** 2011; 123:492-8.

Chen S, Parmigiani G. Meta-Analysis of BRCA1 and BRCA2 penetrance. **J Clin Oncol** 2007; 25:1329-33.

Chan JK, Tian C, Monk BJ, et al. Gynecologic Oncology Group. Prognostic factors for high-risk early-stage epithelial ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group study. **Cancer** 2008; 112:2202-10.

Chan JK, Tian C, Fleming GF, et al. The potential benefit of 6 vs. 3 cycles of chemotherapy in subsets of women with early-stage high-risk epithelial ovarian cancer: an exploratory analysis of a Gynecologic Oncology Group study. **Gynecol Oncol** 2010; 116:301-6.

Chan JK, Brady MF, Penson RT, et al. Weekly vs. Every-3-Week Paclitaxel and Carboplatin for Ovarian Cancer. **N Engl J Med** 2016; 374:738-48.

Chang SJ, Hodeib M, Chang J, Bristow RE. Survival impact of complete cytoreduction to no gross residual disease for advanced-stage ovarian cancer: a meta-analysis. **Gynecol Oncol** 2013; 130:493-8.

Chiang JW, Karlan BY, Cass L, Baldwin RL. BRCA1 promoter methylation predicts adverse ovarian cancer prognosis. **Gynecol Oncol** 2006; 101:403-10.

Chui MH, Gilks CB, Cooper K, Clarke BA. Identifying lynch syndrome in patients with ovarian carcinoma: the significance of tumor subtype. **Adv Anat Pathol** 2013; 20:378-86.

Clinvar. **BRCA1** (gene). Available from: <URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/?term=brca1%5Bgene%5D>> [2016 ago 10].

Conlin LK, Thiel BD, Bonnemann CG, et al. Mechanisms of mosaicism, chimerism and uniparental disomy identified by single nucleotide polymorphism array analysis. **Hum Mol Genet** 2010; 19:1263-75.

Coleman RL, Sill MW, Bell-McGuinn K, et al. A phase II evaluation of the potent, highly selective PARP inhibitor veliparib in the treatment of persistent or recurrent epithelial ovarian, fallopian tube, or primary peritoneal cancer in patients who carry a germline BRCA1 or BRCA2 mutation - An NRG Oncology/Gynecologic Oncology Group study. **Gynecol Oncol** 2015; 137:386-91.

Colombo PE, Fabbro M, Theillet C, Bibeau F, Rouanet P, Ray-Coquard I. Sensitivity and resistance to treatment in the primary management of epithelial ovarian cancer. **Crit Rev Oncol Hematol** 2014; 89:207-16.

Cybulski C, Górski B, Huzarski T, et al. CHEK2 is a multiorgan cancer susceptibility gene. **Am J Hum Genet** 2004; 75:1131-5

D'Andrea AD. BRCA1: a missing link in the Fanconi anemia/BRCA pathway. **Cancer Discov** 2013; 3:376-8.

Dann RB, DeLoia JA, Timms KM, et al. BRCA1/2 mutations and expression: response to platinum chemotherapy in patients with advanced stage epithelial ovarian cancer. **Gynecol Oncol** 2012; 125:677-82.

De Lorenzo SB, Patel AG, Hurley RM, Kaufmann SH. The Elephant and the Blind Men: Making Sense of PARP Inhibitors in Homologous Recombination Deficient Tumor Cells. **Front Oncol** 2013; 3:228.

de Pauw A, Jolissaint L, Fréneaux P, Rouleau E, Stoppa-Lyonnet D, Buecher B. Hereditary forms of ovarian cancer. **Bull Cancer** 2012; 99:453-62.

del Carmen MG, Birrer M, Schorge JO. Clear cell carcinoma of the ovary: a review of the literature. **Gynecol Oncol** 2012; 126:481-90.

Desmond A, Kurian AW, Gabree M, et al. Clinical Actionability of Multigene Panel Testing for Hereditary Breast and Ovarian Cancer Risk Assessment. **JAMA Oncol** 2015; 1:943-51.

Domchek SM, Aghajanian C, Shapira-Frommer R, et al. Efficacy and safety of olaparib monotherapy in germline BRCA1/2 mutation carriers with advanced ovarian cancer and three or more lines of prior therapy. **Gynecol Oncol** 2016; 140:199-203.

Dong A, Lu Y, Lu B. Genomic/Epigenomic alterations in ovarian carcinoma: translational insight into clinical practice. **J Cancer** 2016; 7:1441-51.

du Bois A, Luck HJ, Meier W, et al. A randomized clinical trial of cisplatin/paclitaxel versus carboplatin/paclitaxel as first-line treatment of ovarian cancer. **J Natl Cancer Inst** 2003; 95:1320-9.

du Bois A, Reuss A, Pujade-Lauraine E, Harter P, Ray-Coquard I, Pfisterer J. Role of surgical outcome as prognostic factor in advanced epithelial ovarian cancer: a combined exploratory analysis of 3 prospectively randomized phase 3 multicenter trials: by the Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie Studiengruppe Ovarialkarzinom (AGO-OVAR) and the Groupe d'Investigateurs Nationaux Pour les Etudes des Cancers de l'Ovaire (GINECO). **Cancer** 2009; 115:1234-44.

Duan W, Gao L, Zhao W, et al. Assessment of FANCD2 nuclear foci formation in paraffin-embedded tumors: a potential patient-enrichment strategy for treatment with DNA interstrand crosslinking agents. **Transl Res** 2013; 161:156-64.

Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A. **AJCC cancer staging manual**. 7^a ed. New York: Springer-Verlag, 2010. Ovary and primary peritoneal carcinoma; p.419-23.

Elit L, Hirte H. Palliative systemic therapy for women with recurrent epithelial ovarian cancer: current options. **Onco Targets Ther** 2013; 6:107-18.

Ewald IP, Ribeiro PL, Palmero EI, Cossio SL, Giugliani R, Ashton-Prolla P. Genomic rearrangements in BRCA1 and BRCA2: A literature review. **Genet Mol Biol** 2009; 32:437-46.

Fader AN, Rose PG. Role of surgery in ovarian carcinoma. **J Clin Oncol** 2007; 25:2873-83.

Folkins AK, Longacre TA. Hereditary gynaecological malignancies: advances in screening and treatment. **Histopathology**. 2013; 62:2-30

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

Ford D, Easton DF, Stratton M, et al. Breast Cancer Linkage Consortium. Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. **Am J Hum Genet** 1998; 62:676-89.

Foster JM, Oumie A, Togneri FS, et al. Cross-laboratory validation of the OncoScan® FFPE Assay, a multiplex tool for whole genome tumour profiling. **BMC Med Genomics** 2015; 18:5

Freed-Pastor WA, Prives C. Mutant p53: one name, many proteins. **Genes Dev** 2012; 26:1268-86.

Frumovitz M, Schmeler KM, Malpica A, Sood AK, Gershenson DM. Unmasking the complexities of mucinous ovarian carcinom. **Gynecol Oncol** 2010; 117:491-6.

Gan A, Green AR, Nolan CC, Martin S, Deen S. Poly (adenosine diphosphate-ribose) polymerase expression in BRCA-proficient ovarian high-grade serous carcinoma; association with patient survival. **Hum Pathol** 2013; 44:1638-47.

Garg K, Levine DA, Olvera N, et al. BRCA1 immunohistochemistry in a molecularly characterized cohort of ovarian high-grade serous carcinomas. **Am J Surg Pathol** 2013; 37:138-46.

Gelmon KA, Tischkowitz M, Mackay H, et al. Olaparib in patients with recurrent high-grade serous or poorly differentiated ovarian carcinoma or triple-negative breast cancer: a phase 2, multicentre, open-label, non-randomised study. **Lancet Oncol** 2011; 12:852-61.

George SH, Garcia R, Slomovitz BM, et al. Ovarian cancer: The fallopian tube as the site of origin and opportunities for prevention. **Front Oncol** 2016; 6:108.

George J, Alsop K, Etemadmoghadam D, et al. Nonequivalent gene expression and copy number alterations in high-grade serous ovarian cancers with BRCA1 and BRCA2 mutations. **Clin Cancer Res** 2013; 19:3474-84.

Gordon AN, Fleagle JT, Guthrie D, Parkin DE, Gore ME, Lacave AJ. Recurrent epithelial ovarian carcinoma: a randomized phase III study of pegylated liposomal doxorubicin versus topotecan. **J Clin Oncol** 2001; 19:3312-22.

Graeser M, McCarthy A, Lord CJ, et al. A marker of homologous recombination predicts pathologic complete response to neoadjuvant chemotherapy in primary breast cancer. **Clin Cancer Res** 2010; 16:6159-68.

Grisham RN, Sylvester BE, Won H, et al. Extreme outlier analysis identifies occult mitogen-activated protein kinase pathway mutations in patients with low-grade serous ovarian cancer. **J Clin Oncol** 2015; 33:4099-105.

Groen RS, Gershenson DM, Fader AN. Updates and emerging therapies for rare epithelial ovarian cancers: one Tamahono longer fits all. **Gynecol Oncol** 2015; 136:373-83.

Guo T, Ren Y, Wang B, et al. Promoter methylation of BRCA1 is associated with estrogen, progesterone and human epidermal growth factor receptor-negative tumors and the prognosis of breast cancer: A meta-analysis. **Mol Clin Oncol** 2015; 3:1353-60.

Gurung A, Hung T, Morin J, Gilks CB. Molecular abnormalities in ovarian carcinoma: clinical, morphological and therapeutic correlates. **Histopathology** 2013; 62:59-70.

Harter P, Johnson T, Berton-Rigaud D, et al. BRCA1/2 mutations associated with progression-free survival in ovarian cancer patients in the AGO-OVAR 16 study. **Gynecol Oncol** 2016; 140:443-9.

Hennessy BT, Timms KM, Carey MS, et al. Somatic mutations in BRCA1 and BRCA2 could expand the number of patients that benefit from poly (ADP ribose) polymerase inhibitors in ovarian cancer. **J Clin Oncol** 2010; 28:3570-6.

Hjortkjær M, Waldstrøm M, Jakobsen A, et al. The prognostic value of BRCA1 and PARP expression in epithelial ovarian carcinoma: Immunohistochemical detection. **Int J Gynecol Pathol** 2016 Jun 29. [Epub ahead of print].

Hodgson DR, Dougherty B, Lai Z, et al. Candidate biomarkers of PARP inhibitor sensitivity in ovarian cancer beyond the BRCA genes. In: **Proceedings of the European Congress of Medical Oncology**; 2015 25-29 Sept; Viena-Italy.

Hoeijmakers JH. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. **Nature** 2001; 411:366-74.

Hunn J, Rodriguez GC. Ovarian cancer: etiology, risk factors, and epidemiology. **Clin Obstet Gynecol** 2012; 55:3-23.

Isakoff SJ, Mayer EL, He L, et al. TBCRC009: A Multicenter Phase II Clinical Trial of Platinum Monotherapy With Biomarker Assessment in Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. **J Clin Oncol** 2015; 33:1902-9.

Jazaeri AA, Yee CJ, Sotiriou C, Brantley KR, Boyd J, Liu ET. Gene expression profiles of BRCA1-linked, BRCA2-linked, and sporadic ovarian cancers. **J Natl Cancer Inst** 2002; 94:990-1000.

Judkins T, Rosenthal E, Arnell C, et al. Clinical significance of large rearrangements in BRCA1 and BRCA2. **Cancer** 2012; 118:5210-6.

Khabele D. **PTEN in ovarian cancer**. (Updated June 17, 2015). Available from: <URL:<http://mycancergenome.org/content/disease/ovarian-cancer/pten/>> [2016 jan 12]

Kamieniak MM, Muñoz-Repeto I, Rico D, et al. DNA copy number profiling reveals extensive genomic loss in hereditary BRCA1 and BRCA2 ovarian carcinomas. **Br J Cancer** 2013; 108:1732-42.

Kang J, D'Andrea AD, Kozono D. A DNA repair pathway-focused score for prediction of outcomes in ovarian cancer treated with platinum-based chemotherapy. **J Natl Cancer Inst** 2012; 104:670-81.

Kang HP, Maguire JR, Chu CS, et al. Design and validation of a next generation sequencing assay for hereditary BRCA1 and BRCA2 mutation testing. **Peer J** 2016; 4:e2162.

Katsumata N, Yasuda M, Takahashi F, et al. Dose-dense paclitaxel once a week in combination with carboplatin every 3 weeks for advanced ovarian cancer: a phase 3, open-label, randomised controlled trial. **Lancet** 2009; 374:1331-8.

Katsumata N, Yasuda M, Isonishi S, et al. Japanese Gynecologic Oncology Group.. Long-term results of dose-dense paclitaxel and carboplatin versus conventional paclitaxel and carboplatin for treatment of advanced epithelial ovarian, fallopian tube, or primary peritoneal cancer (JGOG 3016): a randomised, controlled, open-label trial. **Lancet Oncol** 2013; 14:1020-6.

Kaye SB, Lubinski J, Matulonis U, et al. Phase II, open-label, randomized, multicenter study comparing the efficacy and safety of olaparib, a poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor, and pegylated liposomal doxorubicin in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and recurrent ovarian cancer. **J Clin Oncol** 2012; 30:372-9.

Kaufman B, Shapira-Frommer R, Schmutzler RK, et al. Olaparib monotherapy in patients with advanced cancer and a germline BRCA1/2 mutation. **J Clin Oncol** 2015; 33:244-50.

Kavanagh J, Tresukosol D, Edwards C, et al. Carboplatin reinduction after taxane in patients with platinum-refractory epithelial ovarian cancer. **J Clin Oncol** 1995; 13:1584-8.

Kelemen LE, Köbel M. Mucinous carcinomas of the ovary and colorectum: different organ, same dilemm. **Lancet Oncol** 2011; 12:1071-80.

Kohlmann W, Gruber SB. Lynch Syndrome. 2004 Feb 5 [Updated 2012 Sep 20]. In: Pagon RA, Adam MP, Bird TD, et al. editors. **GeneReviews™**. 1993-2013. Available from: <URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1211/>> [2016 aug 10].

Konstantinopoulos PA, Spentzos D, Karlan BY, et al. Gene expression profile of BRCAness that correlates with responsiveness to chemotherapy and with outcome in patients with epithelial ovarian cancer. **J Clin Oncol** 2010; 28:3555-61.

Konstantinopoulos PA, Ceccaldi R, Shapiro GI, D'Andrea AD. Homologous recombination deficiency: exploiting the fundamental vulnerability of ovarian cancer. **Cancer Discov** 2015; 5:1137-54.

Kotsopoulos J, Moody JR, Fan I, et al. Height, weight, BMI and ovarian cancer survival. **Gynecol Oncol** 2012; 127:83-7.

Kotsopoulos J, Rosen B, Fan I, et al. Ten-year survival after epithelial ovarian cancer is not associated with BRCA mutation status. **Gynecol Oncol** 2016; 140:42-7.

Kwa M, Edwards S, Downey A, et al. Ovarian cancer in BRCA mutation carriers: improved outcome after intraperitoneal (IP) cisplatin. **Ann Surg Oncol** 2014; 21:1468-73.

Kwong A, Chen J, Shin VY, et al. The importance of analysis of long-range rearrangement of BRCA1 and BRCA2 in genetic diagnosis of familial breast cancer. **Cancer Genet** 2015; 208:448-54.

Ledermann J, Harter P, Gourley C, et al. Olaparib maintenance therapy in platinum-sensitive relapsed ovarian cancer. **N Engl J Med** 2012; 366:1382-92.

Ledermann J, Harter P, Gourley C, et al. Olaparib maintenance therapy in patients with platinum-sensitive relapsed serous ovarian cancer: a preplanned retrospective analysis of outcomes by BRCA status in a randomised phase 2 trial. **Lancet Oncol** 2014; 15:852-61.

Ledermann JA, Drew Y, Kristeleit RS. Homologous recombination deficiency and ovarian cancer. **Eur J Cancer** 2016; 60:49-58.

Lesnock JL, Darcy KM, Tian C, et al. BRCA1 expression and improved survival in ovarian cancer patients treated with intraperitoneal cisplatin and paclitaxel: a Gynecologic Oncology Group Study. **Br J Cancer** 2013; 108:1231-7.

Lindor NM, Goldgar DE, Tavtigian SV, Plon SE, Couch FJ. BRCA1/2 sequence variants of uncertain significance: a primer for providers to assist in discussions and in medical management. **Oncologist** 2013; 18:518-24.

Lips EH, Mulder L, Oonk A, et al. Triple-negative breast cancer: BRCAness and concordance of clinical features with BRCA1-mutation carriers. **Br J Cancer** 2013; 108:2172-7.

Liu JF, Barry WT, Birrer M, et al. Combination cediranib and olaparib versus olaparib alone for women with recurrent platinum-sensitive ovarian cancer: a randomised phase 2 study. **Lancet Oncol** 2014; 15:1207-14.

Liu G, Yang D, Sun Y, et al. Differing clinical impact of BRCA1 and BRCA2 mutations in serous ovarian cancer. **Pharmacogenomics** 2012; 13:1523-35.

Liu J, Cristea MC, Frankel P, et al. Clinical characteristics and outcomes of BRCA-associated ovarian cancer: genotype and survival. **Cancer Genet** 2012; 205:34-41.

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

Lord CJ, Ashworth A. BRCAness revisited. **Nat Rev Cancer** 2016; 16:110-20.

Lortholary A, Largillier R, Weber B, et al. Weekly paclitaxel as a single agent or in combination with carboplatin or weekly topotecan in patients with resistant ovarian cancer: the CARTAXHY randomized phase II trial from Groupe d'Investigateurs

Nationaux pour l'Etude des Cancers Ovariens (GINECO). **Ann Oncol** 2012; 23:346-52.

Lynch HT, Krush AJ. Carcinoma of the breast and ovary in three families. **Surg Gynecol Obstet** 1971; 133:644-8.

Lu KH, Daniels M. Endometrial and ovarian cancer in women with Lynch syndrome: update in screening and prevention. **Fam Cancer** 2013; 12:273-7.

Mackay HJ, Brady MF, Oza AM, et al. Prognostic relevance of uncommon ovarian histology in women with stage III/IV epithelial ovarian cancer. **Int J Gynecol Cancer** 2010; 20:945-52.

Mafficini A, Simbolo M, Parisi A, et al. BRCA somatic and germline mutation detection in paraffin embedded ovarian cancers by next-generation sequencing. **Oncotarget** 2016; 7:1076-83.

Mangili G, Bergamini A, Taccagni G, et al. Unraveling the two entities of endometrioid ovarian cancer: a single center clinical experience. **Gynecol Oncol** 2012; 126:403-7.

Manié E, Popova T, Battistella A, et al. Genomic hallmarks of homologous recombination deficiency in invasive breast carcinomas. **Int J Cancer** 2016; 138:891-900

Markman M, Bundy BN, Alberts DS, et al. Phase III trial of standard-dose intravenous cisplatin plus paclitaxel versus moderately high-dose carboplatin followed by intravenous paclitaxel and intraperitoneal cisplatin in small-volume stage III ovarian carcinoma: an intergroup study of the gynecologic oncology group, southwestern oncology group, and eastern cooperative oncology group. **J Clin Oncol** 2001; 19:1001-7.

Marquard AM, Eklund AC, Joshi T, et al. Pan-cancer analysis of genomic scar signatures associated with homologous recombination deficiency suggests novel indications for existing cancer drugs. **Biomark Res** 2015; 3:9.

Martins FC, Santiago Id, Trinh A, et al. Combined image and genomic analysis of high-grade serous ovarian cancer reveals PTEN Loss as a common driver event and prognostic classifier. **Genome Biol** 2014; 15:526.

Matulonis UA, Harter P, Gourley C, et al. Olaparib maintenance therapy in patients with platinum-sensitive, relapsed serous ovarian cancer and a BRCA mutation: Overall survival adjusted for postprogression poly(adenosine diphosphate ribose) polymerase inhibitor therapy. **Cancer** 2016; 122:1844-52.

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

McAlpine JN, Porter H, Köbel M, et al. BRCA1 and BRCA2 mutations correlate with TP53 abnormalities and presence of immune cell infiltrates in ovarian high-grade serous carcinoma. **Mod Pathol** 2012; 25:740-50.

McBride KA, Ballinger ML, Killick E. Li-Fraumeni syndrome: cancer risk assessment and clinical management. **Nat Rev Clin Oncol** 2014; 11:260-71.

McEllin B, Camacho CV, Mukherjee, et al. PTEN loss compromises homologous recombination repair in astrocytes: implications for glioblastoma therapy with temozolomide or poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. **Cancer Res** 2010; 70:5457-64.

McGuire WP, Hoskins WJ, Brady MF, et al. Cyclophosphamide and cisplatin compared with paclitaxel and cisplatin in patients with stage III and stage IV ovarian cancer. **N Engl J Med** 1996; 334:1-6.

McLaughlin JR, Rosen B, Moody J, et al. Long-term ovarian cancer survival associated with mutation in BRCA1 or BRCA2. **J Natl Cancer Inst** 2013; 105:141-8.

McNeish IA, Oza AM, Coleman RL, et al. Results of ARIEL2: A Phase 2 trial to prospectively identify ovarian cancer patients likely to respond to rucaparib using tumor genetic analysis. **J Clin Oncol** 2015; 33suppl. [abstract 5508]. [Presented at 2015 ASCO Annual Meeting; 2015 May 29-Jun 2; Chicago].

Meijers-Heijboer EJ, Verhoog LC, Brekelmans CT, et al. Presymptomatic DNA testing and prophylactic surgery in families with a BRCA1 or BRCA2 mutation. **Lancet** 2000; 355:2015-20.

Meisel JL, Hyman DM, Garg K, et al. The performance of BRCA1 immunohistochemistry for detecting germline, somatic, and epigenetic BRCA1 loss in high-grade serous ovarian cancer. **Ann Oncol** 2014; 25:2372-8.

Miesfeldt S, Lamb A, Duarte C. Management of genetic syndromes predisposing to gynecologic cancers. **Curr Treat Options Oncol** 2013; 14:34-50.

Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. **Science** 1994; 266:66-71.

Minion LE, Dolinsky JS, Chase DM, et al. Hereditary predisposition to ovarian cancer, looking beyond BRCA1/BRCA2. **Gynecol Oncol** 2015; 137:86-92.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer José de Alencar Gomes da Silva. **Estimativa/2014 incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2014.

Mittempergher L. Genomic Characterization of High-Grade Serous Ovarian Cancer: Dissecting Its Molecular Heterogeneity as a Road Towards Effective Therapeutic Strategies. **Curr Oncol Rep** 2016; 18:44.

Monk BJ, Dalton H, Farley JH, Chase DM, Benjamin I. Antiangiogenic agents as a maintenance strategy for advanced epithelial ovarian cancer. **Crit Rev Oncol Hematol** 2013; 86:161-75.

Moorman PJ, Havrilesky LJ, Gierisch JM, et al. Oral contraceptives and risk of ovarian cancer and breast cancer among high-risk women: a systematic review and meta-analysis. **J Clin Oncol** 2013; 31:4188-98.

Mutch DG, Orlando M, Goss T, et al. Randomized phase III trial of gemcitabine compared with pegylated liposomal doxorubicin in patients with platinum-resistant ovarian cancer. **J Clin Oncol** 2007; 25:2811-8.

Nakonechny QB, Kilks CB. Ovarian cancer in hereditary cancer susceptibility syndromes. **Surg Pathol Clin** 2016; 9:189-99.

Narod SA, Feunteun J, Lynch HT, et al. Familial breast-ovarian cancer locus on chromosome 17q12-q23. **Lancet** 1991; 388:82-3.

Narod SA. Modifiers of risk of hereditary breast and ovarian cancer. **Nat Rev Cancer** 2002; 2:113.

[NCCN] National Comprehensive Cancer Network. **Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines): Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast and Ovarian.** Version 2. 2014. Available from: <URL:http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/genetics_screening.pdf> [2015 feb 27].

Ngeow J, Sesock K, Eng C. Breast cancer risk and clinical implications for germline PTEN mutation carriers. **Breast Cancer Res Treat** 2015 Dec 23. [Epub ahead of print].

Norquist BM, Harrell MI, Brady MF, et al. Inherited mutations in women with ovarian carcinoma. **JAMA Oncol** 2016; 2:482-90.

Oza AM, Cibula D, Oaknin A, et al. Olaparib plus chemotherapy, followed by maintenance monotherapy, in women with platinum-sensitive recurrent serous ovarian cancer (PSR SOC): BRCA1/2 mutation (BRCAm) and interim overall survival analyses. In: **European Cancer Congress 2013 (ECCO-ESMO-ESTRO)**; 2013, 27 Sep - 01 Oct 2013; Amsterdam, Netherlands.

Oza AM, Cibula D, Benzaquen AO, et al. Olaparib combined with chemotherapy for recurrent platinum-sensitive ovarian cancer: a randomised phase 2 trial. **Lancet Oncol** 2015; 16:87-97.

Ozols RF, Bundy BN, Greer BE, et al. Phase III trial of carboplatin and paclitaxel compared with cisplatin and paclitaxel in patients with optimally resected stage III ovarian cancer: a gynecologic oncology group study. **J Clin Oncol** 2003; 21:3194-200.

Rescigno P, Cerillo I, Ruocco R, Condello C, De Placido S, Pensabene M. New hypothesis on pathogenesis of ovarian cancer lead to future tailored approaches. **Biomed Res Int** 2013; 2013:852839.

Park HJ, Nam EJ, Rha SY, et al. A new prognostic index model using meta-analysis in early-stage epithelial ovarian cancer. **Gynecol Oncol** 2012; 126:357-63.

Patel JN, Sehouli J, Timms K, et al. Characteristics of homologous recombination deficiency (HRD) in paired primary and recurrent high-grade serous ovarian cancer (HGSOC). **J Clin Oncol** 2015; 33suppl. [abstract 5534]. [Presented at 2015 ASCO Annual Meeting; 2015 May 29-Jun 2; Chicago].

Patch AM, Christie EL, Etemadmoghadam D, et al. Whole-genome characterization of chemoresistant ovarian cancer. **Nature** 2015; 521:489-94.

Pécuchet N, Popova T, Manié E, et al. Loss of heterozygosity at 13q13 and 14q32 predicts BRCA2 inactivation in luminal breast carcinomas. **Int J Cancer** 2013; 133:2834-42.

Pennington KP, Walsh T, Harrel MI, et al. Germline and somatic mutations in homologous recombination genes predict platinum response and survival in ovarian, fallopian tube, and peritoneal carcinomas. **Clin Cancer Res** 2014; 20:764-75

Perren TJ, Swart AM, Pfisterer J, et al. A phase 3 trial of bevacizumab in ovarian cancer. **N Engl J Med** 2011; 365:2484-96.

Peterlongo P, Chang-Claude J, Moysich KB, et al. Candidate genetic modifiers for breast and ovarian cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2015; 24:308-16.

Petrucelli N, Daly MB, Feldman GL. BRCA1 and BRCA2 hereditary breast and ovarian cancer. 1998 Sep 4 [Updated 2013 Sep 26]. In: Pagon RA, Adam MP, Bird TD, et al. editors. **GeneReviews™**. 1993-2013. Available from: <URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1247/>> [2015 feb 27].

Piccart MJ, Bertelsen K, James K, et al. Randomized intergroup trial of cisplatin-paclitaxel versus cisplatin-cyclophosphamide in women with advanced epithelial ovarian cancer: three-year results. **J Natl Cancer Inst** 2000; 92:699-708.

Pignata S, Scambia G, Ferrandina G, et al. Carboplatin plus paclitaxel versus carboplatin plus pegylated liposomal doxorubicin as first-line treatment for patients with ovarian cancer: the MITO-2 randomized phase III trial. **J Clin Oncol** 2011; 29:3628-35.

Popova T, Manié E, Rieunier G, et al. Ploidy and large-scale genomic instability consistently identify basal-like breast carcinomas with BRCA1/2 inactivation. **Cancer Res** 2012, 72:5454-62. □

Popova T, Boeva V, Manié E, Rozenholc Y, Barillot E, Sernet M. **Analysis of somatic alterations in cancer genome: from snp arrays to next generation sequencing**. 2013a. Available from: <URL:<http://hal-mines-paristech.archives-ouvertes.fr/hal-01108425/document>> [2015 feb 27].

Popova T, Manié E, Stern M. Genomic signature of homologous recombination deficiency in breast and ovarian cancers. **Bio-Protocol** 2013b; 3:1-8.

Poveda AM, Selle F, Hilpert F, et al. Bevacizumab combined with weekly paclitaxel, pegylated liposomal doxorubicin, or topotecan in platinum-resistant recurrent ovarian cancer: analysis by chemotherapy cohort of the randomized Phase III AURELIA Trial. **J Clin Oncol** 2015; 33:3836-8.

Pradhan M, Risberg BA, Tropé CG, van de Rijn M, Gilks CB, Lee CH. Gross genomic alterations and gene expression profiles of high- grade serous carcinoma of the ovary with and without BRCA1 inactivation. **BMC Cancer** 2010; 10:493

Prat J. Ovarian carcinomas: five distinct diseases with different origins, genetic alterations, and clinicopathological features. **Virchows Arch** 2012; 460:237-49.

Press JZ, De Luca A, Boyd N, et al. Ovarian carcinomas with genetic and epigenetic BRCA1 Perda have distinct molecular abnormalities. **BMC Cancer** 2008; 8:17.

Pujade-Lauraine E, Hilpert F, Weber B, et al. Bevacizumab combined with chemotherapy for platinum-resistant recurrent ovarian cancer: The AURELIA open-label randomized phase III trial. **J Clin Oncol** 2014; 32:1302-8.

Reinbolt RE, Hays JL. The role of PARP inhibitors in the treatment of gynecologic malignancies. **Front Oncol** 2013; 3:237.

Risch HA, McLaughlin JR, Cole DE, et al. Prevalence and penetrance of germline BRCA1 and BRCA2 mutations in a population series of 649 women with ovarian cancer. **Am J Hum Genet** 2001; 68:700-10.

Romero I, Sun CC, Wong KK, Bast RC Jr, Gershenson DM. Low-grade serous carcinoma: new concepts and emerging therapies. **Gynecol Oncol** 2013; 130:660-6.

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

Rustin GJ, Vergote I, Eisenhauer E, et al. Definitions for Response and Progression in Ovarian Cancer Clinical Trials Incorporating RECIST 1.1 and CA 125 Agreed by the Gynecological Cancer Intergroup (GCIIG). **Int J Gynecol Cancer** 2004; 21:419-23.

Sardanelli F, Podo F, D'Agnolo G, et al. Multicenter comparative multimodality surveillance of women at genetic-familial high risk for breast cancer (HIBCRIT study): interim results. **Radiology** 2007; 242:698-715.

See HT, Freedman RS, Kudelka AP, et al. Retrospective review: re-treatment of patients with ovarian cancer with carboplatin after platinum resistance. **Int J Gynecol Cancer** 2005; 15:209-16.

Schouten PC, van Dyk E, Braaf LM, et al. Platform comparisons for identification of breast cancers with a BRCA-like copy number profile. **Breast Cancer Res Treat** 2013; 139:317-27.

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

Skytte AB, Waldstrøm M, Rasmussen AA, Crüger D, Woodward ER, Kølvråa S. Identification of BRCA1-deficient ovarian cancers. **Acta Obstet Gynecol Scand** 2011; 90:593-9.

Stany MP, Vathipadiekal V, Ozbun L, et al. Identification of novel therapeutic targets in microdissected clear cell ovarian cancers. **PLoS One** 2011; 6:e21121.

Stecklein SR, Jensen RA. Identifying and exploiting defects in the Fanconi anemia/BRCA pathway in oncology. **Transl Res** 2012; 160:178-97.

Stefansson OA, Villanueva A, Vidal A, Martí L, Esteller M. BRCA1 epigenetic inactivation predicts sensitivity to platinum-based chemotherapy in breast and ovarian cancer. **Epigenetics** 2012; 7:1225-9.

Swisher EM, Gonzalez RM, Taniguchi T, et al. Methylation and protein expression of DNA repair genes: association with chemotherapy exposure and survival in sporadic ovarian and peritoneal carcinomas. **Mol Cancer** 2009; 8:48.

Synowiec A, Wcisło G, Bodnar L, et al. Clinical features and outcomes of germline mutation BRCA1-linked versus sporadic ovarian cancer patients. **Hered Cancer Clin Pract** 2016; 14:1

Tan DS, Rothermundt C, Thomas K, et al. "BRCAness" syndrome in ovarian cancer: a case-control study describing the clinical features and outcome of patients with epithelial ovarian cancer associated with BRCA1 and BRCA2 mutations. **J Clin Oncol** 2008; 26:5530-6.

Tan DS, Kaye SB. Chemotherapy for Patients with BRCA1 and BRCA2-Mutated Ovarian Cancer: Same or Different? **Am Soc Clin Oncol Educ Book** 2015:114-21.

Telli ML, Jensen KC, Vinayak S, et al. Phase II Study of Gemcitabine, Carboplatin, and Iniparib As Neoadjuvant Therapy for Triple-Negative and BRCA1/2 Mutation-Associated Breast Cancer With Assessment of a Tumor-Based Measure of Genomic Instability: PrECOG 0105. **J Clin Oncol** 2015; 33:1895-901.

Telli ML, Timms KM, Reid J, et al. Homologous Recombination Deficiency (HRD) score predicts response to platinum-containing neoadjuvant chemotherapy in patients with triple-negative breast cancer. **Clin Cancer Res** 2016; 22:3764-73.

Tewari D, Java JJ, Salani R, et al. Long-term survival advantage and prognostic factors associated with intraperitoneal chemotherapy treatment in advanced ovarian cancer: a gynecologic oncology group study. **J Clin Oncol** 2015; 33:1460-6.

[TCGARN] The Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. **Nature** 2011; 474:609-15.

Thrall M, Gallion HH, Kryscio R, Kapali M, Armstrong DK, DeLoia JA. BRCA1 expression in a large series of sporadic ovarian carcinomas: a Gynecologic Oncology Group study. **Int J Gynecol Cancer** 2006; 16 Suppl 1:166-71

Timms KM, Abkevich V, Hughes E, et al. Association of BRCA1/2 defects with genomic scores predictive of DNA damage repair deficiency among breast cancer subtypes. **Breast Cancer Res** 2014; 16:475.

Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. **CA Cancer J Clin** 2015; 65:87-108.

Trimbos JB, Parmar M, Vergote I, et al. International Collaborative Ovarian Neoplasm trial 1 and Adjuvant ChemoTherapy In Ovarian Neoplasm trial: two parallel randomized phase III trials of adjuvant chemotherapy in patients with early-stage ovarian carcinoma. **J Natl Cancer Inst** 2003; 95:105-12.

Tuna M, Ju Z, Smid M, et al. Prognostic relevance of acquired uniparental disomy in serous ovarian cancer. **Mol Cancer** 2015; 14:29.

Van Loo P, Nordgard SH, Lingjærde OC, et al. Allele-specific copy number analysis of tumors. **Proc Natl Acad Sci USA** 2010; 107:16910-5.

Vasey PA, Jayson GC, Gordon A, et al. Phase III randomized trial of docetaxel-carboplatin versus paclitaxel-carboplatin as first-line chemotherapy for ovarian carcinoma. **J Natl Cancer Inst** 2004; 96:1682-91.

Vencken PM, Reitsma W, Krieger M, et al. Outcome of BRCA1- compared with BRCA2-associated ovarian cancer: a nationwide study in the Netherlands. **Ann Oncol** 2013; 24:2036-42.

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

Wang Y, Moorhead M, Karlin-Neumann G et al. Analysis of molecular inversion probe performance for allele copy number determination. **Genome Biol** 2007; 8:R246.

Wang Y, Carlton VE, Karlin-Neumann G et al. High quality copy number and genotype data from FFPE samples using Molecular Inversion Probe (MIP) microarrays. **BMC Med Genomics** 2009; 19:2-8.

Warner E, Messersmith H, Causer P, Eisen A, Shumak R, Plewes D. Systematic review: using magnetic resonance imaging to screen women at high risk for breast cancer. **Ann Intern Med** 2008; 148:671-9.

Watkins JA, Irshad S, Grigoriadis A, Tutt AN. Genomic scars as biomarkers of homologous recombination deficiency and drug response in breast and ovarian cancers. **Breast Cancer Res** 2014; 16:211.

Watson P, Butzow R, Lynch HT, et al. The clinical features of ovarian cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. **Gynecol Oncol** 2001; 82:223-8.

Weissman SM, Weiss SM, Newlin AC. Genetic testing by cancer site: ovary. **Cancer J** 2012; 18:320-7.

Whittemore AS, Balise RR, Pharoah PD, et al. Oral contraceptive use and ovarian cancer risk among carriers of BRCA1 or BRCA2 mutations. **Br J Cancer** 2004; 91:1911-5.

Yamamoto KN, Hirota K, Takeda S, Haeno H. Evolution of pre-existing versus acquired resistance to platinum drugs and PARP inhibitors in BRCA-associated cancers. **PLoS One** 2014; 9:e105724.

Yamashita Y. Ovarian cancer: new developments in clear cell carcinoma and hopes for targeted therapy. **Jpn J Clin Oncol** 2015; 45:405-7.

Xu W, Rush J, Rickett K, Coward JI. Mucinous ovarian cancer: a therapeutic review. **Crit Rev Oncol Hematol** 2016; 102:26-36.

Zhang S, Royer R, Li S, et al. Frequencies of BRCA1 and BRCA2 mutations among 1,342 unselected patients with invasive ovarian cancer. **Gynecol Oncol** 2011; 121:353-7.

Anexo 1 - Carta de aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa-CEP



A.C. Camargo
Cancer Center

Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP

São Paulo, 24 de março de 2016.

À

Dra. Maria Isabel Waddington Achatz

Aluno: Alexandre André Balciro Anastácio da Costa (Doutorado)

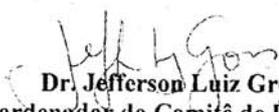
Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1933/14

“Alteração da via da recombinação homóloga de reparo de DNA no câncer epitelial de ovário”.

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – A.C. Camargo Cancer Center, em sua última reunião de 22/03/2016, **tomaram conhecimento e aprovaram** os seguintes documentos:

- Comunicado de alteração do título do estudo em referência, anteriormente intitulado: “Impacto prognóstico da presença de mutações germinativas e somáticas em pacientes com câncer de ovário epitelial”;
- Emenda ao projeto em documento datado de 01 de dezembro de 2015.

Atenciosamente,


Dr. Jefferson Luiz Gross

1º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

Anexo 2 - Ficha de Coleta de Dados – Ovário

1-Identificação:

1.1 Nome: _____

1.2 RGH-HC: _____

1.3 Data de nascimento _____/_____/_____. 1.4 Data Dx: _____/_____/_____.

2- Dados cirúrgicos:

A- Cirurgia inicial:

A.1- Data Cx: _____/_____/_____

A.2- Momento: (1) Citorredução primária (2) Citorredução intervalo _____ I _____ I

A.3- Doença residual: (1) microscópica (Completa) (2) < 10mm (3) > 10mm

(4) “ótima” sem especificação - I _____ I

A.4- Procedimentos realizados:	(0)Não (1) Sim
HTA	
SOB	
Omentectomia	
Linfadenectomia pélvica	
Linfadenectomia paraórtica	
Ressecção intestinal	
Esplenectomia	
Cx adequada	
Preservação de fertilidade	
QT IP (HIPEC)	

A.5- Complicações Cx:	
Óbito < 28d	(0)Não (1) Sim

Nº AP	Data AP	Momento do tto: (1) Cx inic. (2) Rec Plat S (3) RecPlat R (4) Cito Intervalo

B- Dados da cirurgia recidiva:

B.1- Data Cx: _____/_____/_____.

B.2- Momento: (1) Primeira recidiva (2) Segunda recidiva (3) Terceira recidiva (4) Quarta ou mais I _____ I

B.3- Doença residual: (1) microscópica (Completa) (2) < 10mm (3) > 10mm

(4) “ótima” sem especificação - I _____ I

B.4- QT intraperitoneal hipertérmica: (1) sim (0) não _____ I _____ I

Droga e dose: _____ Óbito < 28 dias: (1) sim (0) não _ I _____ I

C- Dados da cirurgia recidiva:

C.1- Data Cx: _____/_____/_____.

C.2- Momento: (1) Primeira recidiva (2) Segunda recidiva (3) Terceira recidiva

(4) Quarta ou mais ----- I _____ I

C.3- Doença residual: (1) microscópica (Completa) (2) < 10mm (3) > 10mm

(4) "ótima" sem especificação - I _____ I

C.4- QT intraperitoneal hipertérmica: (1) sim (0) não ----- I _____ I

Droga e dose: _____ Óbito < 28 dias: (1) sim (0) não _ I _____ I

3- Fatores Prognósticos iniciais:

Idade na primeira cx	
Histologia	
Grau FIGO	
Estágio FIGO	
CA125 pré tto inicial(cirurgia/qt neo)	
CA 125 pós op	
Plqt pré tto inicial (cirurgia / qt neo)	
Plqt pós cirurgia	
ECOG pré qt (ou pré cx caso sem qt)	

Comorbidades (ver anestesia):
História familiar:
Outras neoplasias:

4- Tratamento QT inicial :

A - drogas e posologia: _____

B - número de ciclos totais: _____

C - **data início:** _____ / _____ / _____ **data de término :**
_____ / _____ / _____

D- se interrupção antes de 6 ciclos por toxicidade qual? _____

E - QT neoadjuvante:

- quantos ciclos antes da cirurgia: _____

- resposta à qt neo: (1) RC (2) RP (3) DE (4) PD

- CA 125 pré qt / pós qt: _____ / _____

5- Seguimento inicial e primeira recidiva:

A- CA 125:

Data						
Valor						
Data						
Valor						

B- Recidiva:

B.1- Data da recidiva por marcador: _____ / _____ / _____

B.2- Valor CA 125 na recidiva: _____

B.3- Data da recidiva por imagem: _____ / _____ / _____

B.4- Sintomática: (0)Não (1) Sim -----

I _____ I

B.5- Alteração de imagem: (0)Não (1) Sim, não mensurável (2) Sim, mensurável -----

I _____ I

B.6- Sítio recidiva (anotar todos): _____

1ª rec. Platina S – data marcador:		Plaquetas e Hb pré qt	
CA 125 pré qt – pós qt		Drogas e posol	
Data por imagem:		Data início	
Tamanho maior tumor		Data término	
Sítios (anotar todos peritôn. vale 1)		Resp. por imag.	(1) RC (2) RP (3) DE (4) PD
ECOG pré QT		Resp por Marc.	(1) RC (2) RP (3) DE (4) PD
2ª recidiva PS - data		3ª recidiva PS - data	
Drogas		Drogas	
Data início		Data início	
Data término		Data término	
Tipo de resp.	(1) RC (2) RP (3) DE (4) PD	Tipo de resp.	(1) RC (2) RP (3) DE (4) PD
Resp por Marc.	(1) RC (2) RP (3) DE (4) PD	Resp por Marc.	(1) RC (2) RP (3) DE (4) PD
4ª recidiva PS - data		5ª recidiva PS - data	
Drogas		Drogas	
Data início		Data início	
Data término		Data término	
Tipo de resp.	(1) RC (2) RP (3) DE (4) PD	Tipo de resp.	(1) RC (2) RP (3) DE (4) PD
Resp por Marc.	(1) RC (2) RP (3) DE (4) PD	Resp por Marc.	(1) RC (2) RP (3) DE (4) PD
6ª recidiva PS - data		7ª recidiva PS - data	
Drogas		Drogas	
Data início		Data início	
Data término		Data término	
Tipo de resp.	(1) RC (2) RP (3) DE (4) PD	Tipo de resp.	(1) RC (2) RP (3) DE (4) PD
Resp por Marc.	(1) RC (2) RP (3) DE (4) PD	Resp por Marc.	(1) RC (2) RP (3) DE (4) PD

OBS: Resposta e progressão por marcador CA 125 – critérioc GCIG:**Resposta:** queda de 50% em relação ao marcador inicial (que deve ser de 2 sem antes de iniciar o tto)**Progressão:****- Marcador normal ao início do tto:** aumento para mais de 2x o valor da normalidade**- Marcador aumentado ao início do tto:** aumento para mais de 2x o valor do nadir após início do tto

Data	(0) Vivo (1) Óbito	(0) SED (1) Recidivada	(0) aguarda retorno (1) perda de seg.
Telefones e email:			

* A partir da 2ª recidiva anotar apenas a data que vier primeiro, progressão por marcador ou imagem

1ª rec. Platina R – data marcador:		Plaquetas e Hb pré qt	
CA 125 pré qt – pós qt		Drogas e posol	
Data por imagem:		Data início	
Tamanho maior tumor		Data término	
Sítios (anotar todos peritôn. vale 1)		Resp. por imag.	(1) RC (2) RP (3) DE (4) PD
ECOG pré QT		Resp por Marc.	(1) RC (2) RP (3) DE (4) PD
2ª recidiva PR - data		3ª recidiva PR - data	
Drogas		Drogas	
Data início		Data início	
Data término		Data término	
Tipo de resp.	(1) RC (2) RP (3) DE (4) PD	Tipo de resp.	(1) RC (2) RP (3) DE (4) PD
Resp por Marc.	(1) RC (2) RP (3) DE (4) PD	Resp por Marc.	(1) RC (2) RP (3) DE (4) PD
4ª recidiva PR - data		5ª recidiva PR - data	
Drogas		Drogas	
Data início		Data início	
Data término		Data término	
Tipo de resp.	(1) RC (2) RP (3) DE (4) PD	Tipo de resp.	(1) RC (2) RP (3) DE (4) PD
Resp por Marc.	(1) RC (2) RP (3) DE (4) PD	Resp por Marc.	(1) RC (2) RP (3) DE (4) PD
6ª recidiva PR - data		7ª recidiva PR - data	
Drogas		Drogas	
Data início		Data início	
Data término		Data término	
Tipo de resp.	(1) RC (2) RP (3) DE (4) PD	Tipo de resp.	(1) RC (2) RP (3) DE (4) PD
Resp por Marc.	(1) RC (2) RP (3) DE (4) PD	Resp por Marc.	(1) RC (2) RP (3) DE (4) PD

Uso de bevacizumabe em alguma linha (0)Não (1) Sim Qual -----

I_____I

Meta SNC algum momento (0)Não (1) Sim -----

I_____I

Hormonioterapia em algum momento (0)Não (1) Sim -----

I_____I

6.Última aval.:

Anexo 3 – Artigos

A partir da análise inicial dos dados clínicos publicamos um artigo na revista *Annals of Surgical Oncology* (FI 3,9) (da Costa et al 2016), colaboramos com dados para a publicação de um segundo artigo na mesma revista (Baiocchi et al 2015), e publicamos um terceiro artigo na revista *International Journal of Gynecologic Cancer* (FI 1,9) (da Costa et al 2016), e um quarto artigo está em fase de submissão. Seguem em anexo a este relatório.

da Costa AA, Valadares CV, Baiocchi G, Mantoan H, Saito A, Sanches S, Guimarães AP, Achatz MI. Neoadjuvant Chemotherapy Followed by Interval Debulking Surgery and the Risk of Platinum Resistance in Epithelial Ovarian Cancer. *Ann Surg Oncol*. 2015 Dec;22 Suppl 3:S971-8. doi: 10.1245/s10434-015-4623-z. Epub 2015 May 27. PubMed PMID: 26014155.

da Costa AA, Valadares CV, Mantoan H, Saito A, Salvadori MM, Guimarães AP, Sanches SM, Achatz MI, Baiocchi G. The Value of Secondary Cytoreductive Surgery in Recurrent Ovarian Cancer and Application of a Prognostic Score. *Int J Gynecol Cancer*. 2016 Mar;26(3):449-55. doi: 10.1097/IGC.0000000000000649. PubMed PMID: 26825830.

Baiocchi G, Ferreira FO, Mantoan H, da Costa AA, Faloppa CC, Kumagai LY, de Mello CA, Takahashi RM, Nakagawa WT, Aguiar S Jr, et al. Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy after Secondary Cytoreduction in Epithelial Ovarian Cancer: A Single-center Comparative Analysis. *Ann Surg Oncol*. 2016 Apr;23(4):1294-301.

Anexo 4 – Log2 ratio e frequência do alelo B em uma visão do genoma completo de cada amostra testada pelo ensaio ONCOSCAN - gráficos gerados pelo programa ChAS V3.1.0. BAF = frequência do alelo B.

Figura 1 anexo – Caso 1.

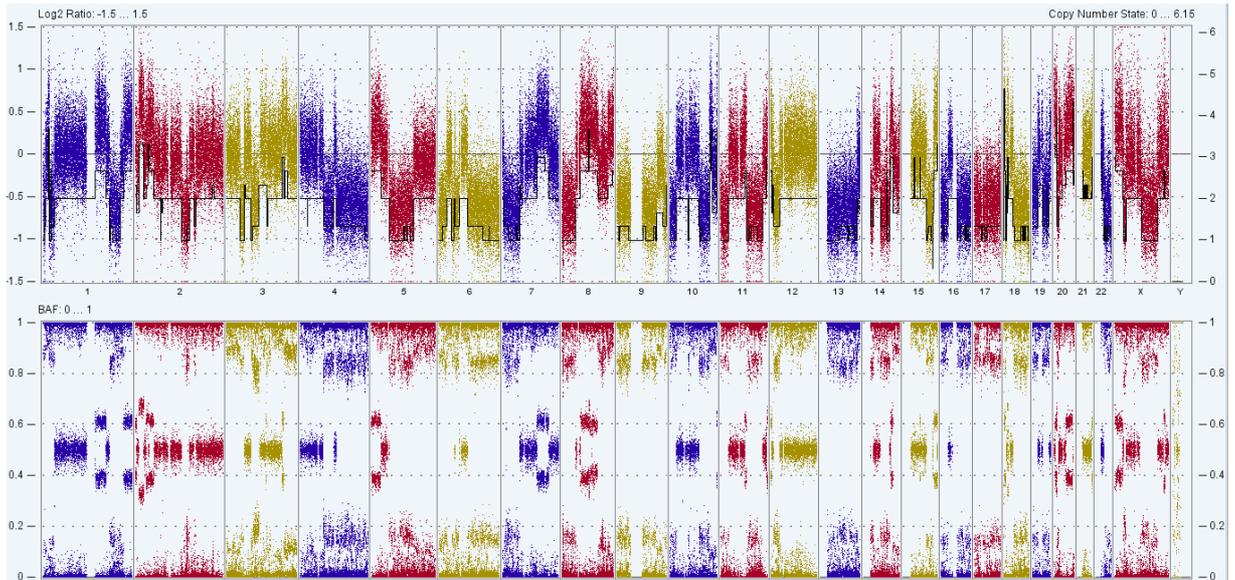


Figura 2 anexo – Caso 2

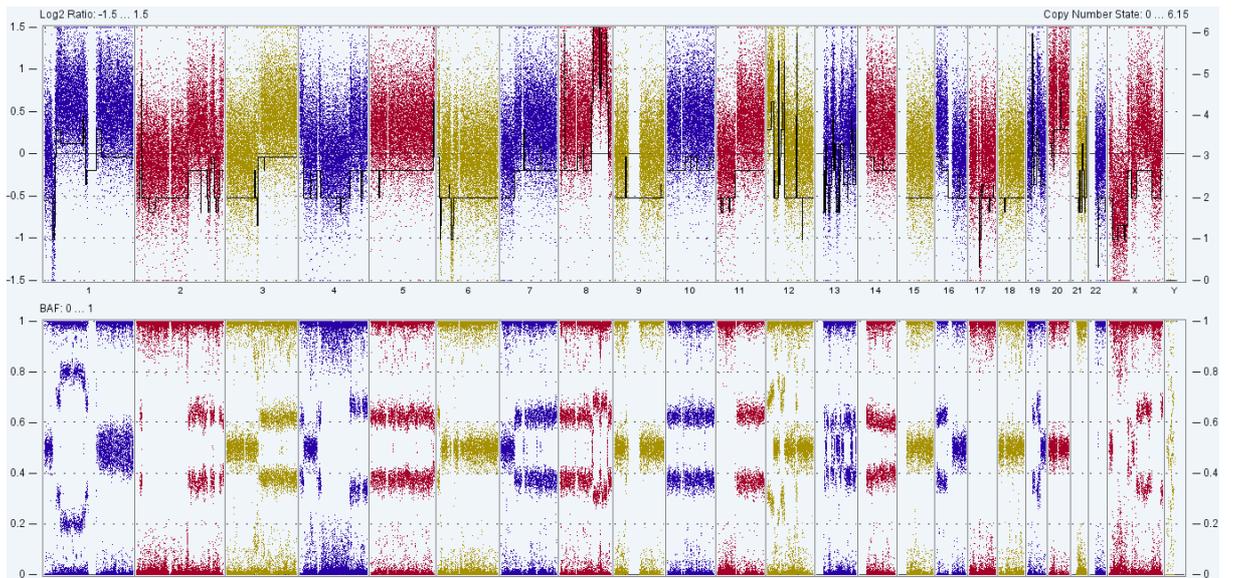


Figura 3 anexo – Caso 3

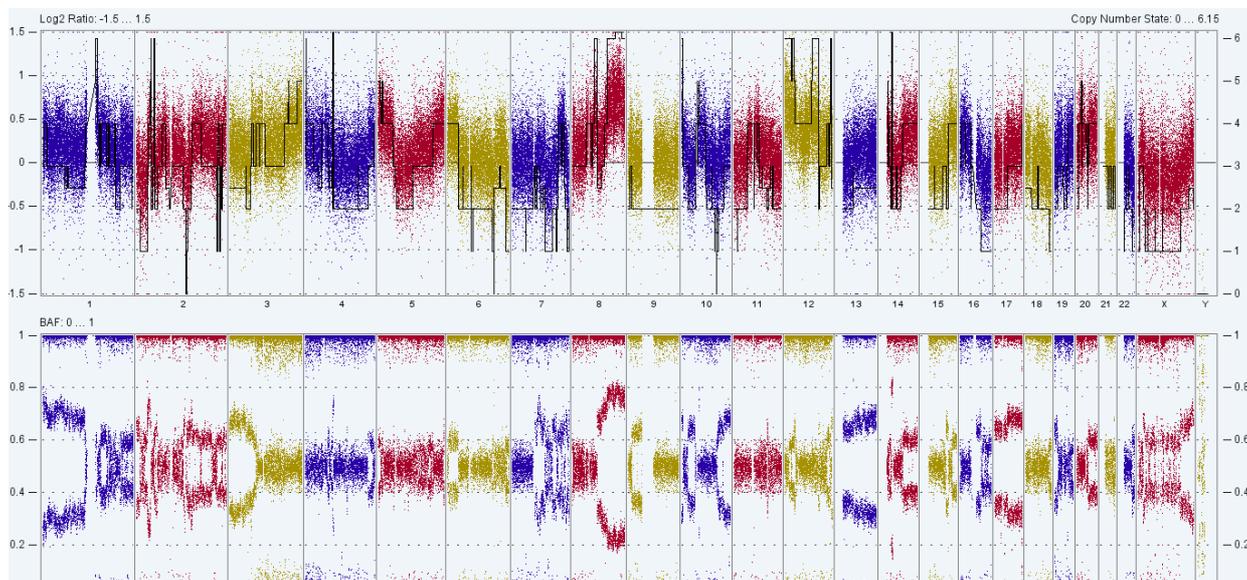


Figura 4 anexo – Caso 4

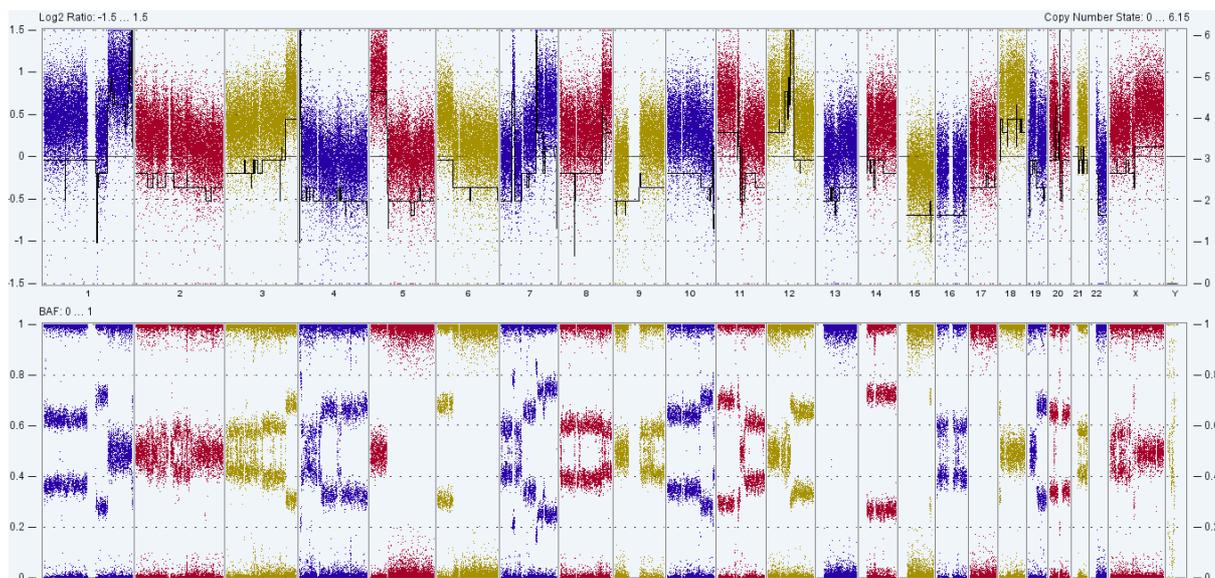


Figura 5 anexo – caso 7

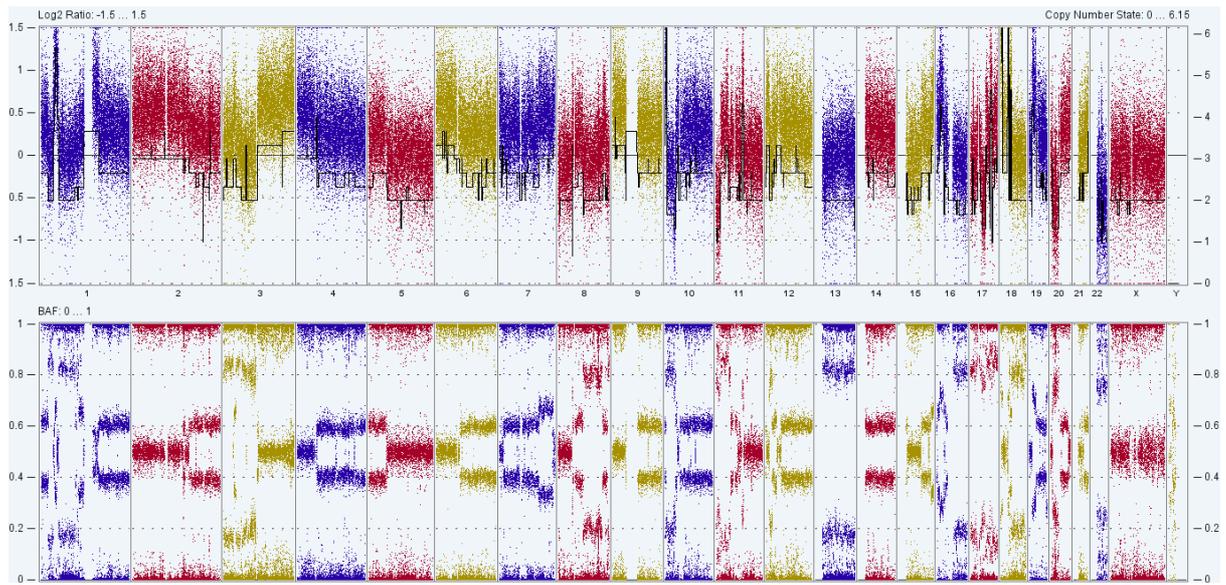


Figura 6 anexo – caso 10

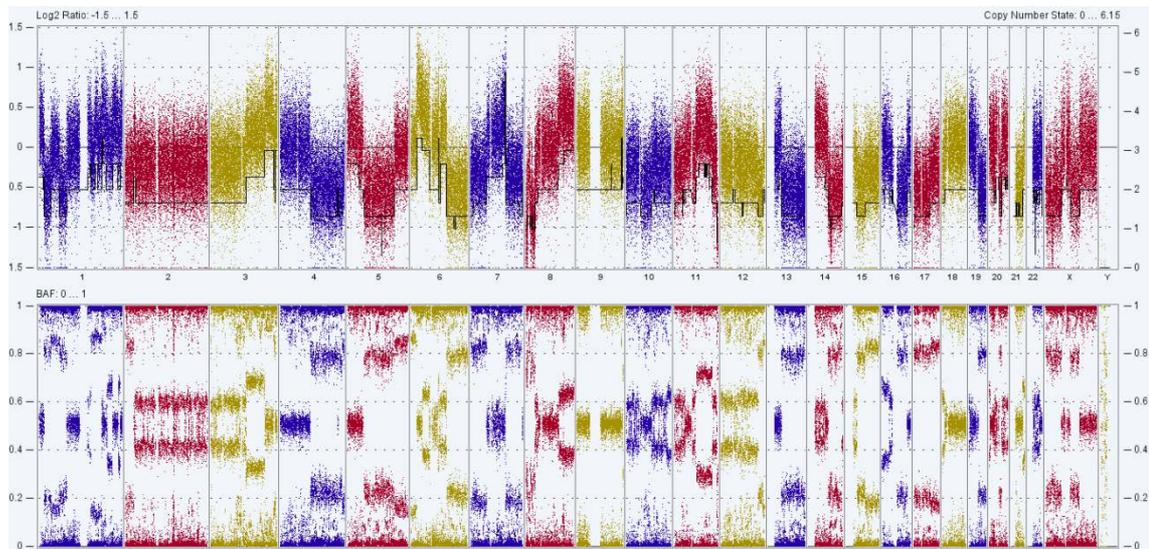


Figura 7 anexo – caso 15

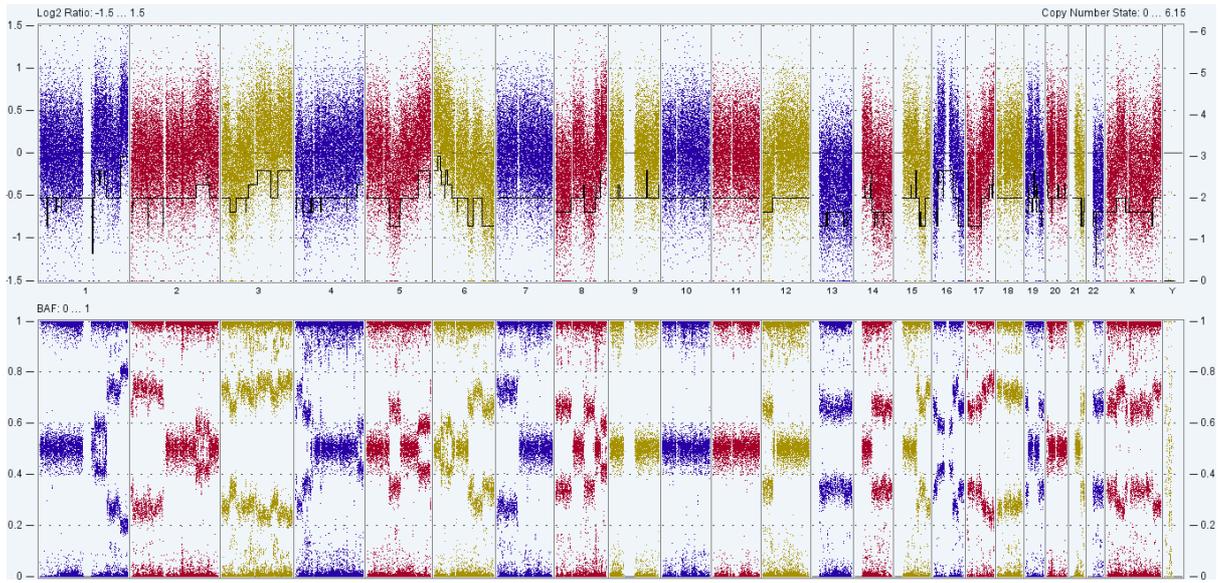


Figura 8 anexo – caso 16

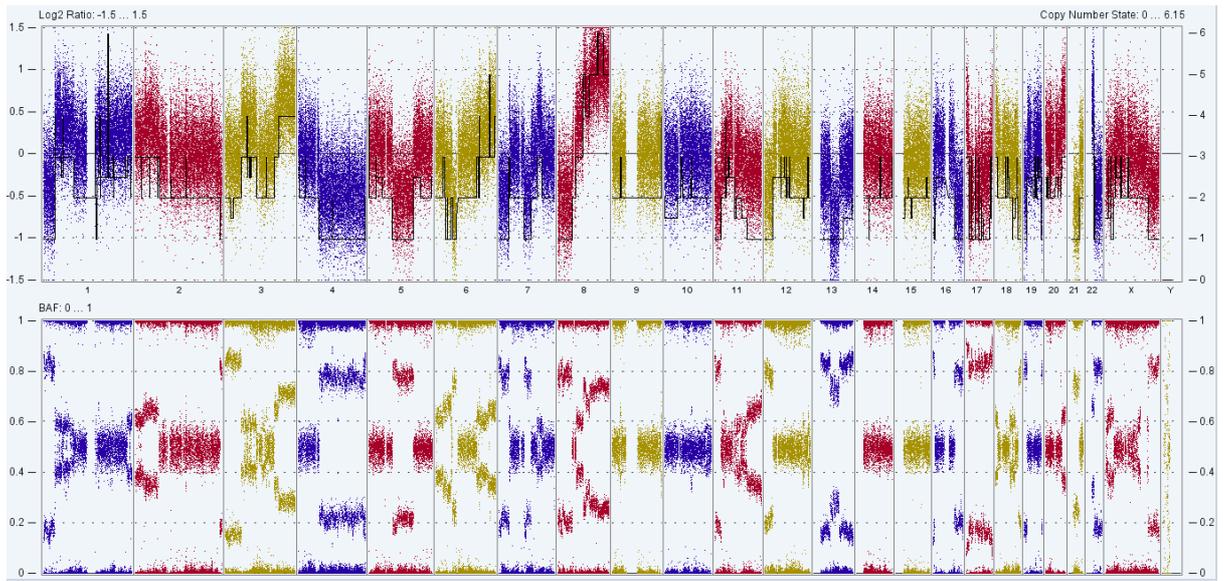


Figura 9 anexo – caso 19

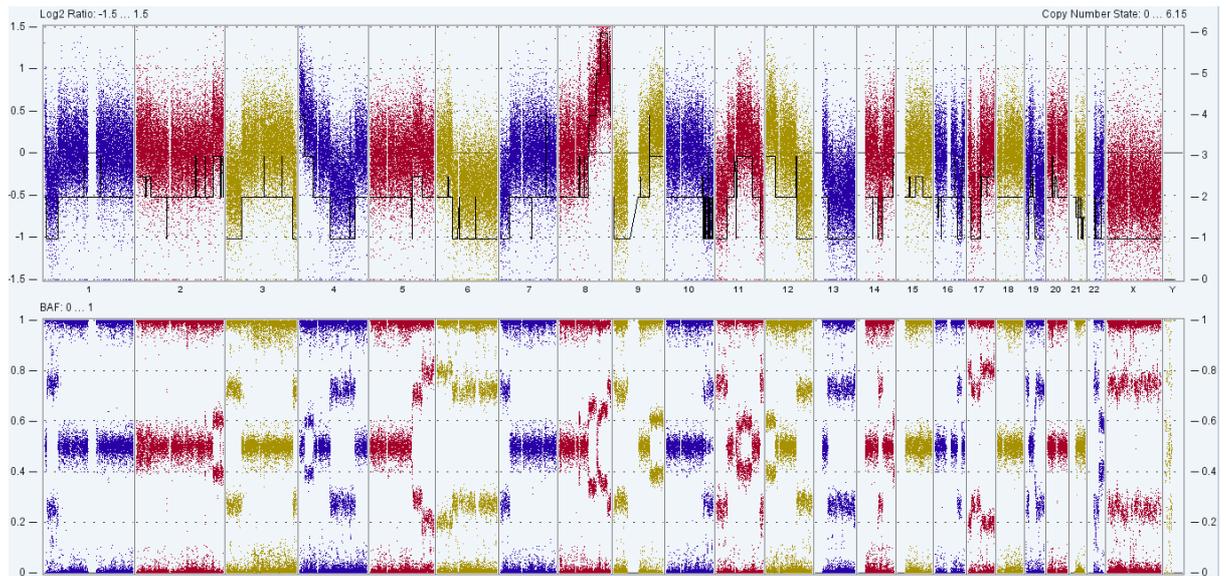


Figura 10 anexo – caso 20

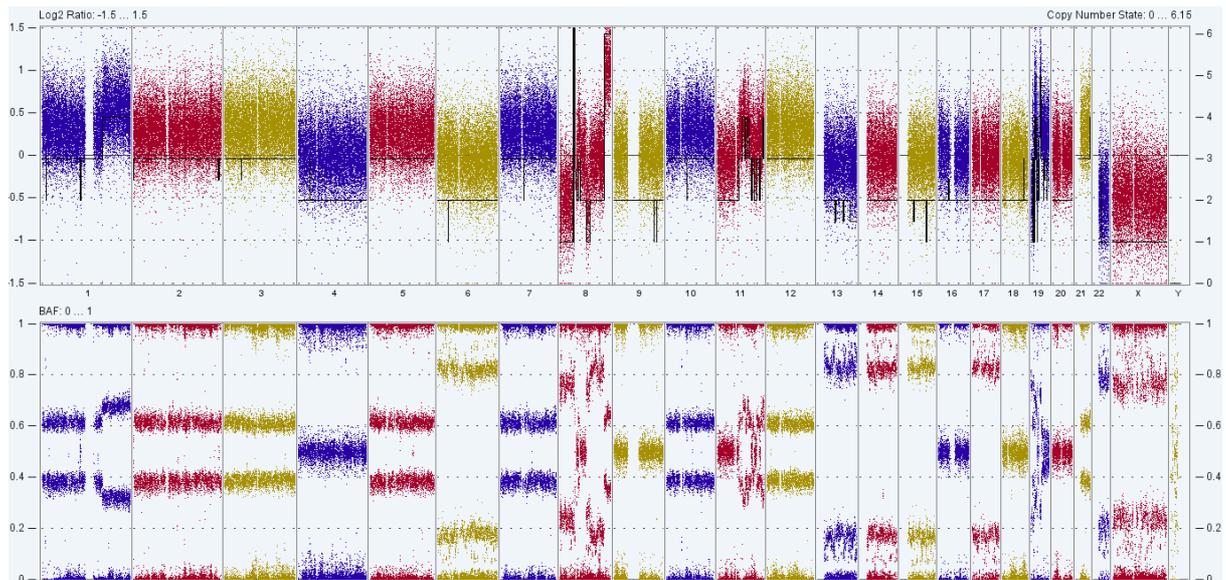


Figura 11 anexo – caso 25

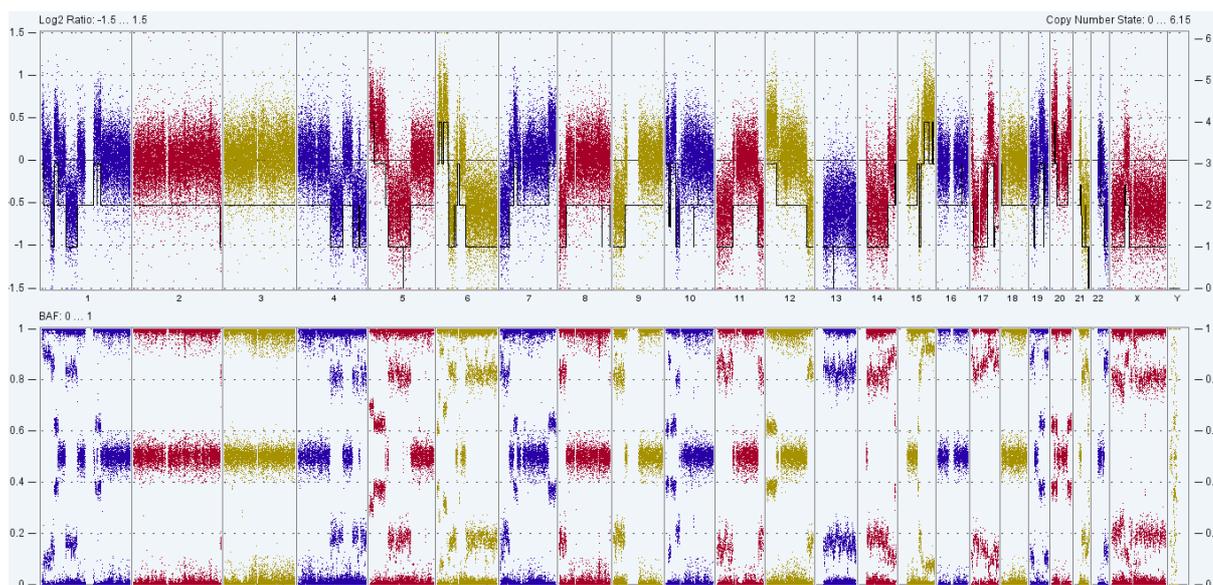


Figura 12 anexo – caso 27

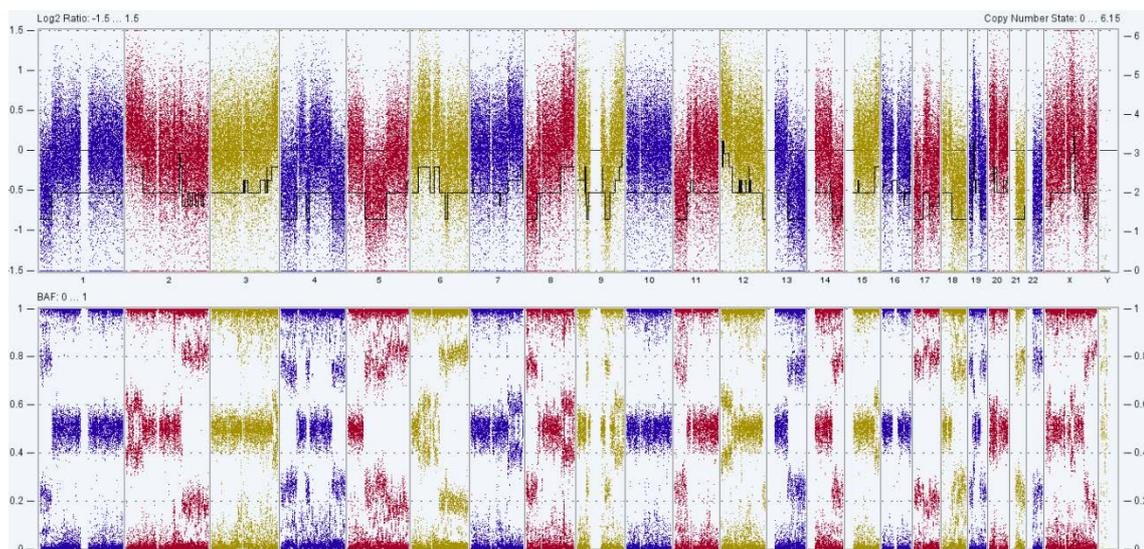


Figura 13 anexo – caso 28 – A

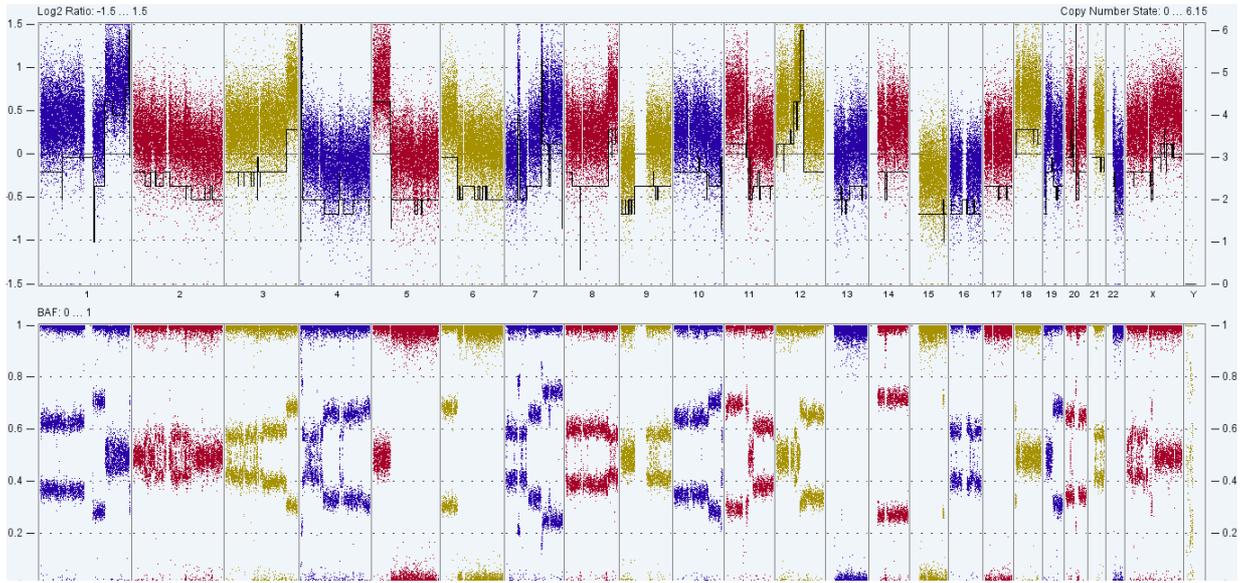


Figura 14 anexo – caso 28 – B

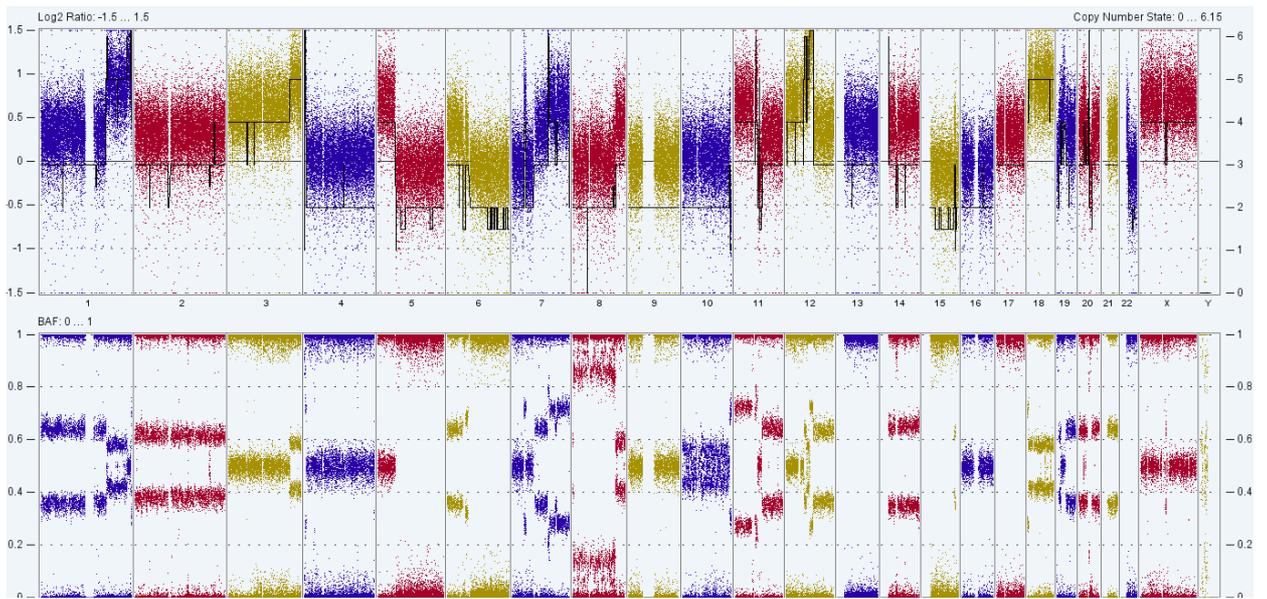
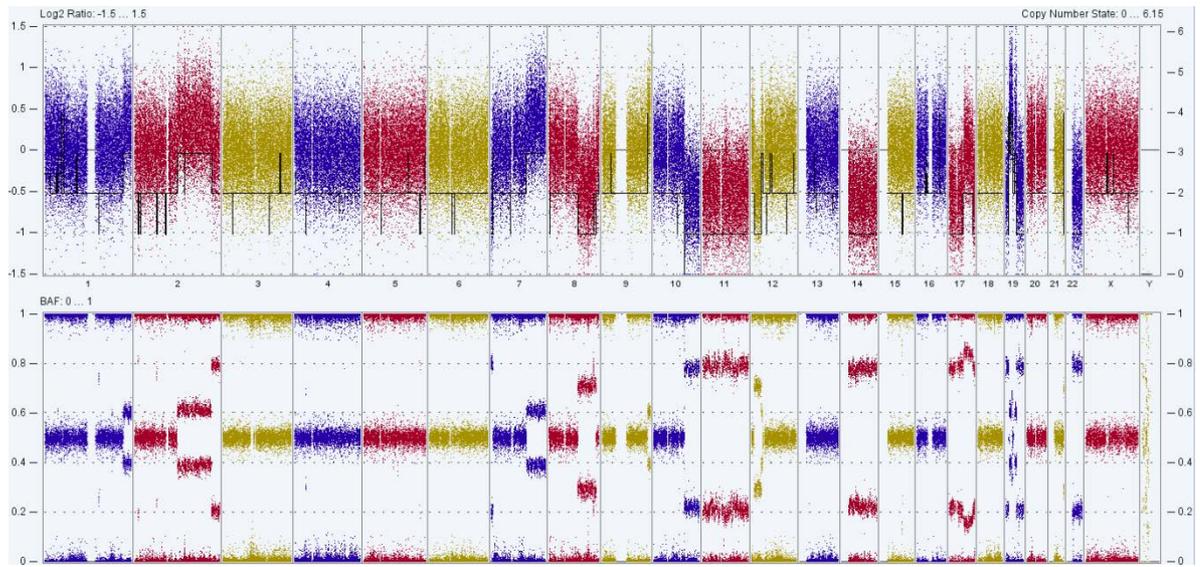


Figura 15 anexo – caso 29



Anexo 5 – Tabelas com resultados do ensaio ONCOSCAN descrevendo as alterações segmentares encontradas em cada amostra

Tabela 1 anexo – Caso 1

Número de cópias	Tipo	Cromossomo	Citobanda de início	Tamanho(kbp)	Quantidade de Genes	OMIM® Quantidade de Genes
3.67	Ganho	1	p36.21	2,599	46	22
2.67	Ganho	1	q21.1	30,465	565	367
2.67	Ganho	1	q41	25,358	228	97
2.67	Ganho	2	p22.2	14,123	90	57
3.33	Ganho	2	p22.3	1,357	2	1
2.33	Ganho	2	p23.2	5,818	26	18
3.33	Ganho	2	p25.1	14,111	67	42
2.33	Ganho	2	p25.3	3,008	11	7
2.33	Ganho	2	q34	5,421	19	12
2.33	Ganho	3	p11.1	22,489	99	47
2.33	Ganho	3	p21.31	1,910	44	33
3.00	Ganho	3	q25.2	5,292	33	19
2.67	Ganho	3	q26.1	6,575	18	11
2.67	Ganho	5	p15.33	26,381	96	50
2.33	Ganho	7	p12.3	2,336	11	5
3.00	Ganho	7	q21.3	33,733	285	165
2.67	Ganho	8	q11.21	22,324	104	60
3.67	Ganho	8	q13.3	2,356	20	12
2.67	Ganho	8	q21.11	22,772	99	56
2.33	Ganho	8	q22.1	2,410	20	14
2.67	Ganho	8	q24.21	17,893	154	81
2.33	Ganho	9	q34.3	2,080	91	49
2.67	Ganho	10	q25.1	2,806	22	15
3.67	Ganho	10	q25.2	2,760	19	12
2.67	Ganho	10	q25.3	3,612	28	18
2.67	Ganho	10	q26.3	831	2	0
3.67	Ganho	10	q26.3	1,838	33	16
2.67	Ganho	11	q13.3	4,192	55	32

2.33	Ganho	11	q24.3	5,255	27	15
2.33	Ganho	12	p13.31	1,993	59	47
2.67	Ganho	12	p13.33	1,509	13	10
2.67	Ganho	14	q24.1	401	2	2
3.00	Ganho	14	q24.3	7,171	10	6
3.00	Ganho	15	q21.2	840	5	3
2.67	Ganho	15	q26.1	8,852	49	20
3.33	Ganho	15	q26.3	3,155	28	14
3.00	Ganho	18	p11.21	2,619	24	15
2.67	Ganho	18	p11.32	3,355	16	8
2.33	Ganho	19	p13.11	14,003	159	92
2.33	Ganho	20	p11.21	9,991	120	65
4.00	Ganho	20	p12.3	846	2	1
3.00	Ganho	20	p12.3	1,212	2	2
3.33	Ganho	20	p13	3,312	72	39
3.00	Ganho	20	p13	3,790	40	26
2.67	Ganho	20	q11.23	20,954	205	116
2.33	Ganho	20	q13.32	2,909	30	15
2.67	Ganho	20	q13.33	3,432	89	51
2.33	Ganho	21	q21.1	2,286	8	4
2.33	Ganho	21	q21.3	1,114	3	0
2.67	Ganho	21	q22.3	3,225	72	36
2.67	Ganho	X	p22.33	23,421	132	101
2.67	Ganho	X	q27.1	4,588	24	16
1.33	Perda	1	p36.13	14,091	213	122
1.00	Perda	1	p36.33	5,604	109	56
1.00	Perda	1	q25.3	30,808	235	166
1.67	Perda	2	p13.2	1,116	20	14
1.00	Perda	2	p13.3	1,644	24	14
1.67	Perda	2	p25.3	5,740	21	9
1.00	Perda	2	q14.3	21,749	93	43
1.33	Perda	2	q24.2	4,351	16	13
1.33	Perda	3	p14.1	21,296	47	26
1.00	Perda	3	p22.2	12,014	182	118
1.33	Perda	3	q13.2	1,454	22	10
1.33	Perda	4	q13.1	29,790	190	135

1.33	Perda	4	q24	89,664	343	205
1.00	Perda	5	q11.1	67,277	294	175
1.33	Perda	6	p21.1	11,393	78	51
1.00	Perda	6	p21.31	7,735	112	75
1.33	Perda	6	p25.3	21,781	116	68
1.00	Perda	6	q14.1	90,420	461	278
1.00	Perda	7	p22.3	44,911	298	182
1.00	Perda	8	p23.3	38,312	285	156
1.33	Perda	9	p24.3	111,948	543	292
1.67	Perda	9	q31.3	17,209	148	78
1.33	Perda	9	q33.3	9,557	183	115
1.00	Perda	10	p15.3	17,237	104	55
1.00	Perda	10	q11.23	3,353	26	13
1.00	Perda	10	q23.1	28,978	256	161
1.67	Perda	10	q26.11	11,845	82	41
1.00	Perda	11	p15.5	23,344	356	204
1.00	Perda	11	q13.4	46,571	349	213
1.33	Perda	12	p13.31	17,182	172	118
1.67	Perda	12	p13.33	3,841	38	26
1.00	Perda	13	q11	86,243	404	211
1.67	Perda	13	q33.3	7,128	48	25
1.33	Perda	14	q11.2	7,286	138	95
1.33	Perda	14	q21.3	19,956	151	99
1.00	Perda	14	q24.1	7,165	84	51
1.67	Perda	14	q31.3	16,603	213	91
1.00	Perda	15	q23	18,612	217	118
0.33	Perda	15	q25.3	1,169	2	0
1.67	Perda	15	q25.3	2,434	30	21
1.00	Perda	16	p13.3	20,443	316	183
1.00	Perda	16	q11.2	43,206	414	268
1.00	Perda	17	p13.3	79,862	1,351	822
1.00	Perda	18	p11.31	3,226	16	5
1.00	Perda	18	p11.32	941	11	8
1.00	Perda	18	q12.1	49,859	214	128
1.33	Perda	19	p13.3	16,129	509	324
1.00	Perda	19	q12	14,770	350	196

1.33	Perda	19	q13.32	6,010	271	163
1.33	Perda	20	p12.2	4,289	15	8
1.00	Perda	22	q12.1	25,167	369	245
1.33	Perda	X	p21.3	6,365	19	13
1.00	Perda	X	q13.3	46,273	229	139
1.00	Perda	X	q28	847	16	6
	LOH	1	p36.33	31,633	491	276
	LOH	1	q25.3	39,978	278	191
	LOH	2	q14.3	23,238	94	44
	LOH	2	q24.2	5,093	20	16
	LOH	3	p14.1	21,998	48	26
	LOH	3	p26.3	51,452	420	271
	LOH	3	q25.33	38,133	247	151
	LOH	4	q13.1	30,440	190	135
	LOH	4	q23	90,259	349	209
	LOH	5	q11.1	131,256	848	538
	LOH	6	p25.3	58,566	708	468
	LOH	6	q14.1	90,526	463	279
	LOH	7	p22.3	47,459	330	200
	LOH	8	p23.3	38,644	287	158
	LOH	8	q22.1	47,537	280	161
	LOH	9	p24.3	140,850	962	532
	LOH	10	p15.3	17,642	107	57
	LOH	10	q11.23	3,761	32	13
	LOH	10	q23.1	32,520	278	176
	LOH	10	q25.3	18,612	143	75
	LOH	11	p15.5	23,841	356	204
	LOH	11	q13.4	47,083	356	217
	LOH	12	p13.31	17,427	173	119
	LOH	13	q11	96,018	460	240
	LOH	14	q11.2	7,839	150	95
	LOH	14	q21.3	28,824	241	153
	LOH	14	q31.3	21,555	279	126

	LOH	15	q22.33	22,942	256	144
	LOH	16	p13.3	20,968	325	188
	LOH	16	q11.2	43,697	420	272
	LOH	17	p13.3	79,862	1,351	822
	LOH	18	p11.31	4,100	18	6
	LOH	18	q12.1	49,970	214	128
	LOH	19	p13.3	16,190	510	325
	LOH	19	q12	21,289	640	376
	LOH	20	p12.3	4,613	16	8
	LOH	20	q13.32	6,352	119	66
	LOH	22	q12.1	25,271	369	245
	LOH	X	p21.3	6,951	19	13
	LOH	X	q13.1	51,446	284	169

Tabela 2 anexo – Caso 2

Número de cópias	Tipo	Cromossomo	Citobanda de início	Tamanho(kbp)	Quantidade de Genes	OMIM ® Quantidade de Genes
2.33	Ganho	1	p13.2	1,526	15	14
2.67	Ganho	1	p13.2	29,292	61	34
3.50	Ganho	1	p35.3	84,693	707	419
3.67	Ganho	1	q21.1	14,391	364	236
3.00	Ganho	1	q23.2	89,537	764	451
5.00	Ganho	2	p24.3	1,327	1	1
2.67	Ganho	2	p25.1	3,031	18	8
2.67	Ganho	2	q22.2	33,617	155	113
2.67	Ganho	2	q31.2	17,568	67	48
2.67	Ganho	2	q33.2	5,180	39	21
3.00	Ganho	2	q34	7,651	27	18
2.67	Ganho	2	q36.3	12,492	155	92
3.00	Ganho	3	p11.1	109,116	687	400
2.67	Ganho	4	p12	10,800	54	36
3.00	Ganho	4	p16.3	10,582	144	70
2.67	Ganho	4	q31.1	30,237	129	78
2.67	Ganho	4	q34.1	14,819	62	27
2.67	Ganho	5	p14.2	151,287	849	541
2.67	Ganho	5	p15.33	22,873	93	48
4.33	Ganho	5	q35.2	3,169	55	32
3.00	Ganho	5	q35.3	1,650	37	17
2.33	Ganho	6	p21.33	427	50	39
3.00	Ganho	6	p25.3	5,744	40	23
2.67	Ganho	7	p14.1	25,075	124	71
3.67	Ganho	7	q11.21	3,090	30	11
2.67	Ganho	7	q11.21	93,345	733	410
2.67	Ganho	8	p23.3	88,977	505	292
4.33	Ganho	8	q21.3	3,833	16	10
6.33	Ganho	8	q21.3	18,256	102	65
4.67	Ganho	8	q23.2	5,360	3	2
6.00	Ganho	8	q23.3	15,638	78	39

4.33	Ganho	8	q24.22	3,740	17	11
3.00	Ganho	8	q24.22	10,224	119	65
3.00	Ganho	9	p21.1	1,894	12	9
2.30	Ganho	9	q34.11	3,007	71	46
2.67	Ganho	10	p15.3	135,308	921	521
2.67	Ganho	11	p11.12	84,303	954	571
2.33	Ganho	12	p11.21	1,777	2	1
5.33	Ganho	12	p11.22	2,486	20	10
4.33	Ganho	12	p13.31	8,515	105	72
3.67	Ganho	12	p13.33	9,479	149	107
3.67	Ganho	12	q11	9,886	35	22
5.33	Ganho	12	q13.11	1,185	19	13
4.00	Ganho	12	q21.31	2,760	4	1
2.67	Ganho	13	q12.11	2,174	10	5
3.33	Ganho	13	q12.13	1,710	12	7
2.33	Ganho	13	q12.2	5,319	42	19
2.33	Ganho	13	q13.3	3,939	32	14
3.00	Ganho	13	q14.11	2,212	15	7
4.00	Ganho	13	q14.12	3,136	24	12
2.67	Ganho	13	q14.2	2,092	25	18
3.33	Ganho	13	q14.3	1,437	15	4
2.33	Ganho	13	q14.3	3,766	19	10
2.67	Ganho	13	q21.32	3,392	5	2
3.33	Ganho	13	q21.33	7,123	19	14
2.50	Ganho	13	q22.3	20,519	57	32
3.33	Ganho	13	q32.1	1,217	6	4
4.00	Ganho	13	q32.2	763	9	4
3.67	Ganho	13	q32.3	2,300	13	7
3.00	Ganho	13	q33.1	1,104	13	5
2.33	Ganho	13	q33.1	8,134	30	13
3.33	Ganho	13	q34	1,508	4	2
3.67	Ganho	13	q34	1,730	26	16
2.67	Ganho	14	q11.2	87,063	778	437
2.67	Ganho	16	p13.3	34,113	529	295
2.33	Ganho	17	q12	5,244	163	95
2.33	Ganho	17	q25.1	4,375	116	69

2.33	Ganho	19	p12	8,950	37	10
6.00	Ganho	19	p13.12	887	24	11
3.00	Ganho	19	p13.12	4,185	118	82
2.33	Ganho	19	p13.2	7,442	235	135
3.67	Ganho	19	q12	3,987	23	11
2.67	Ganho	19	q13.11	7,498	205	115
2.33	Ganho	19	q13.2	18,213	746	386
3.67	Ganho	20	p13	62,843	653	369
2.67	Ganho	21	q21.1	3,278	5	1
3.33	Ganho	21	q22.11	1,662	34	5
3.00	Ganho	21	q22.11	1,721	29	15
4.00	Ganho	21	q22.3	2,876	66	32
2.67	Ganho	X	p11.22	10,689	51	34
2.67	Ganho	X	q21.1	42,772	211	126
2.67	Ganho	X	q28	7,977	139	93
1.00	Perda	1	p36.12	7,937	150	90
1.67	Perda	2	p23.1	21,085	114	72
1.67	Perda	2	q33.1	4,602	44	22
1.67	Perda	2	q35	6,456	28	18
1.33	Perda	3	p12.1	1,869	5	2
1.67	Perda	4	q25	2,887	16	13
1.00	Perda	6	p21.2	7,144	100	68
1.00	Perda	6	p25.1	4,089	27	13
1.00	Perda	6	q12	3,099	6	4
1.67	Perda	11	p13	2,467	24	18
1.67	Perda	11	p15.4	5,886	34	25
1.67	Perda	13	q11	1,518	12	5
1.67	Perda	13	q12.12	1,799	19	11
1.67	Perda	13	q13.1	5,929	30	17
1.67	Perda	13	q21.1	6,415	12	4
1.67	Perda	13	q21.31	2,732	2	1
1.00	Perda	17	q11.2	5,546	85	58
1.67	Perda	17	q23.2	2,201	16	11
1.67	Perda	21	q21.1	1,962	2	1
1.67	Perda	21	q21.2	5,770	35	15
1.67	Perda	21	q22.13	1,712	11	9

1.67	Perda	22	q11.23	1,855	45	22
1.67	Perda	22	q13.31	1,966	6	0
1.33	Perda	X	p22.2	42,638	301	216
	LOH	1	p36.12	99,511	914	552
	LOH	2	p24.3	129,149	798	456
	LOH	2	p25.3	10,633	51	29
	LOH	2	q31.1	1,901	13	6
	LOH	2	q32.3	1,396	1	1
	LOH	2	q32.3	8,680	70	39
	LOH	2	q35	14,071	115	76
	LOH	3	p21.31	5,093	153	97
	LOH	4	q12	81,558	361	250
	LOH	4	q32.1	3,337	15	8
	LOH	4	q32.3	6,730	23	14
	LOH	5	p13.1	4,966	24	13
	LOH	5	p14.2	903	0	0
	LOH	6	p21.2	7,154	100	68
	LOH	6	p22.1	2,700	78	38
	LOH	6	p25.1	4,626	35	17
	LOH	10	q11.21	1,638	17	5
	LOH	10	q24.32	3,984	54	33
	LOH	11	p15.5	51,383	512	303
	LOH	13	q11	2,704	25	15
	LOH	13	q12.12	1,415	15	9
	LOH	13	q13.1	7,131	40	21
	LOH	16	p11.2	5,211	100	41
	LOH	17	p13.3	79,855	1,351	822
	LOH	19	p13.3	15,094	481	308
	LOH	21	q11.2	33,753	295	145
	LOH	22	q11.1	35,159	549	337
	LOH	X	p22.2	43,724	311	224
	LOH	X	q11.2	4,172	13	10
	LOH	X	q13.1	8,088	72	42
	LOH	X	q24	27,934	157	90

Tabela 3 anexo – Caso 3

Número de cópias	Tipo	Cromossomo	Citobanda de início	Tamanho(kbp)	Quantidade de Genes	OMIM® Quantidade de Genes
4.00	Ganho	1	p13.1	3,790	29	20
3.00	Ganho	1	p36.33	116,790	1,203	706
6.00	Ganho	1	q21.1	4,636	58	31
4.00	Ganho	1	q21.2	4,112	151	111
3.00	Ganho	1	q21.3	4,832	143	89
4.00	Ganho	1	q23.1	15,425	208	133
3.00	Ganho	1	q25.1	4,092	17	9
4.00	Ganho	1	q25.2	3,470	30	17
3.00	Ganho	1	q25.3	17,984	76	55
3.00	Ganho	1	q32.3	36,934	289	134
3.00	Ganho	2	p12	10,253	70	41
4.00	Ganho	2	p13.3	9,805	94	62
3.00	Ganho	2	p16.1	13,404	69	39
3.00	Ganho	2	p21	2,939	21	13
6.00	Ganho	2	p21	2,722	14	11
4.00	Ganho	2	p22.3	6,585	36	19
3.00	Ganho	2	p23.2	3,362	21	15
3.00	Ganho	2	q11.1	30,983	214	110
3.00	Ganho	2	q22.3	1,958	4	3
4.00	Ganho	2	q23.1	25,736	120	87
3.00	Ganho	2	q31.1	41,887	234	145
4.00	Ganho	2	q35	5,971	74	52
3.00	Ganho	2	q36.2	4,054	21	10
4.00	Ganho	2	q37.1	11,869	149	87
4.00	Ganho	3	p13	24,145	40	19
4.00	Ganho	3	p14.2	4,628	11	4
3.00	Ganho	3	p14.2	8,514	35	17
3.00	Ganho	3	p14.3	1,375	13	9
2.50	Ganho	3	p26.3	41,163	231	148
3.00	Ganho	3	q11.2	53,314	366	211

4.00	Ganho	3	q25.1	34,110	164	98
5.00	Ganho	3	q27.1	14,019	147	87
4.00	Ganho	4	p12	16,370	65	43
3.00	Ganho	4	p15.2	23,361	78	44
4.00	Ganho	4	p16.3	21,314	181	90
3.00	Ganho	4	q13.1	3,819	1	0
3.00	Ganho	4	q13.2	4,678	46	35
7.00	Ganho	4	q13.3	1,389	10	7
3.00	Ganho	4	q33	14,510	45	24
4.00	Ganho	4	q35.1	5,941	37	16
3.00	Ganho	5	p13.1	6,197	34	19
4.00	Ganho	5	p15.2	26,677	79	46
5.00	Ganho	5	p15.31	4,089	15	8
4.00	Ganho	5	p15.32	3,170	19	7
5.00	Ganho	5	p15.33	6,152	41	22
3.00	Ganho	5	q15	54,713	382	261
4.00	Ganho	5	q32	31,161	245	149
4.00	Ganho	6	p25.3	28,820	247	160
3.00	Ganho	6	q22.33	31,552	189	115
3.00	Ganho	7	q11.1	1,770	3	0
3.00	Ganho	7	q11.22	10,704	99	48
2.50	Ganho	7	q21.11	4,297	24	16
3.00	Ganho	7	q31.33	589	2	1
4.00	Ganho	7	q31.33	9,518	87	54
3.00	Ganho	7	q33	1,894	10	6
4.00	Ganho	7	q34	5,447	79	39
2.50	Ganho	7	q35	3,443	24	5
4.00	Ganho	8	p11.23	14,924	73	54
3.00	Ganho	8	p23.3	36,990	264	141
3.00	Ganho	8	q11.21	3,227	12	8
4.00	Ganho	8	q11.23	5,856	26	18
6.00	Ganho	8	q12.1	7,659	46	23
2.50	Ganho	8	q13.2	11,238	46	26
3.00	Ganho	8	q21.13	9,268	38	22
4.00	Ganho	8	q21.3	6,931	43	22
6.00	Ganho	8	q22.1	49,936	290	167

3.00	Ganho	9	p24.1	4,351	6	4
4.00	Ganho	10	p11.21	31,484	153	64
3.00	Ganho	10	p15.2	12,967	79	43
6.00	Ganho	10	p15.3	3,262	18	5
3.00	Ganho	10	q25.3	19,759	152	80
4.00	Ganho	11	p12	32,388	535	318
3.00	Ganho	11	q13.4	21,499	149	85
3.00	Ganho	11	q21	14,729	67	42
4.00	Ganho	12	p11.22	45,051	439	288
5.00	Ganho	12	p13.2	17,965	127	79
6.00	Ganho	12	p13.33	10,731	178	130
5.00	Ganho	12	q21.1	1,552	3	1
6.00	Ganho	12	q21.1	17,215	62	39
3.00	Ganho	12	q22	21,208	183	115
4.00	Ganho	12	q24.21	9,972	125	76
6.00	Ganho	12	q24.32	3,152	11	0
3.00	Ganho	12	q24.33	4,423	40	23
3.00	Ganho	13	q14.2	66,052	251	133
4.00	Ganho	14	q11.2	2,532	64	31
3.00	Ganho	14	q11.2	2,131	76	57
4.00	Ganho	14	q12	1,713	7	5
3.00	Ganho	14	q12	4,765	12	6
17.00	Ganho	14	q12	4,487	26	18
3.00	Ganho	14	q22.3	6,708	44	29
4.00	Ganho	14	q23.2	42,790	439	222
3.00	Ganho	15	q22.2	8,547	91	55
4.00	Ganho	15	q24.3	24,537	209	99
3.00	Ganho	16	p11.2	3,335	15	0
3.00	Ganho	16	p13.3	7,689	222	132
4.00	Ganho	16	p13.3	23,735	293	161
3.00	Ganho	17	q12	21,604	441	282
3.00	Ganho	17	q23.2	20,718	313	189
2.50	Ganho	18	p11.32	15,365	90	46
3.00	Ganho	18	q12.2	4,218	6	1
3.00	Ganho	19	p13.2	16,334	402	231
3.00	Ganho	19	q11	5,611	24	11

3.00	Ganho	19	q13.12	22,152	853	441
4.00	Ganho	20	p12.3	19,902	108	62
2.50	Ganho	20	p13	4,753	94	55
3.00	Ganho	20	q11.21	6,064	114	64
4.00	Ganho	20	q11.23	27,314	320	179
3.00	Ganho	21	p11.2	25,779	142	53
3.00	Ganho	21	q22.13	7,388	80	56
3.00	Ganho	X	p22.32	8,898	44	32
2.50	Ganho	X	q27.2	12,881	123	78
1.00	Perda	2	p25.1	20,148	151	96
0.00	Perda	2	q21.2	1,272	3	3
1.00	Perda	2	q21.2	3,783	18	10
1.00	Perda	6	q22.31	7,559	29	19
1.00	Perda	6	q25.3	10,674	64	36
1.00	Perda	7	q21.13	20,717	227	134
1.00	Perda	7	q31.32	1,598	9	6
1.00	Perda	7	q36.2	3,015	12	8
1.00	Perda	7	q36.3	1,341	7	2
1.00	Perda	10	q23.33	5,398	66	41
1.00	Perda	16	q21	30,469	301	192
1.00	Perda	18	q22.2	10,782	43	24
1.00	Perda	22	q13.2	9,724	148	87
1.00	Perda	X	p22.12	97,189	557	363
1.00	Perda	X	p22.33	4,513	31	29
	LOH	2	p16.3	4,856	24	13
	LOH	2	p25.3	32,162	203	126
	LOH	2	q14.3	22,850	96	46
	LOH	2	q35	1,283	11	9
	LOH	2	q36.1	1,252	7	4
	LOH	3	p22.1	18,106	284	176
	LOH	6	q22.31	7,599	29	19
	LOH	6	q25.3	10,243	58	32
	LOH	7	q11.1	29,438	174	89
	LOH	7	q21.13	32,920	280	170
	LOH	7	q35	11,970	108	58
	LOH	9	p23	28,343	195	116

	LOH	10	p13	19,430	102	62
	LOH	10	q23.33	23,216	216	140
	LOH	11	p11.2	3,225	12	2
	LOH	13	q11	96,018	460	240
	LOH	15	q23	7,733	95	60
	LOH	15	q25.3	13,807	105	54
	LOH	16	q11.2	14,307	120	80
	LOH	16	q21	28,688	300	192
	LOH	17	p13.3	35,849	581	341
	LOH	17	q23.1	1,183	12	5
	LOH	19	p13.3	7,281	226	161
	LOH	22	q13.1	10,876	163	98
	LOH	X	p22.2	140,489	946	610

Tabela 4 anexo – Caso 4

Número de cópias	Tipo	Cromossomo	Citobanda de início	Tamanho(kbp)	Quantidade de Genes	OMIM® Quantidade de Genes
3.00	Ganho	1	p32.1	117,926	982	626
2.67	Ganho	1	p36.33	58,321	828	471
4.50	Ganho	1	q25.2	67,058	487	310
6.00	Ganho	1	q44	975	3	2
3.00	Ganho	1	q44	2,958	68	8
2.33	Ganho	2	p12	74,302	397	207
2.33	Ganho	2	p16.1	23,074	163	101
2.67	Ganho	2	p21	11,515	47	29
2.33	Ganho	2	p23.1	15,310	92	53
2.67	Ganho	2	p25.3	31,993	202	125
2.33	Ganho	2	q34	3,041	10	9
2.67	Ganho	3	p26.3	166,340	1,051	621
3.67	Ganho	3	q26.1	31,437	228	140
15.00	Ganho	4	p16.3	1,341	28	17
9.33	Ganho	4	p16.3	435	10	8
3.67	Ganho	4	p16.3	1,720	23	13
4.33	Ganho	5	p15.33	46,363	187	101
3.00	Ganho	6	p25.3	42,550	575	382
2.33	Ganho	7	p11.2	40,172	224	122
4.00	Ganho	7	p14.3	6,279	35	17
5.33	Ganho	7	q21.3	3,642	106	64
3.33	Ganho	7	q22.1	17,360	99	56
2.33	Ganho	7	q31.31	4,266	15	11
3.33	Ganho	7	q31.32	34,708	311	165
2.33	Ganho	8	p23.3	117,502	626	368
3.67	Ganho	8	q23.3	28,616	212	114
2.33	Ganho	9	q21.11	70,070	677	381
2.67	Ganho	10	p15.3	94,390	563	307
2.33	Ganho	10	q23.33	33,821	310	191
3.00	Ganho	10	q26.2	2,446	7	4

3.33	Ganho	11	p15.5	57,830	595	325
4.33	Ganho	11	q12.1	1,792	36	14
3.00	Ganho	11	q12.1	3,307	109	73
2.33	Ganho	11	q13.4	59,783	446	263
3.33	Ganho	12	p13.33	48,954	396	263
4.33	Ganho	12	q13.12	6,720	179	121
3.67	Ganho	12	q13.2	2,305	96	67
4.33	Ganho	12	q14.1	6,906	25	15
6.00	Ganho	12	q14.3	9,667	54	38
2.67	Ganho	12	q21.1	59,030	437	261
2.33	Ganho	13	q13.3	3,084	17	8
2.33	Ganho	13	q21.31	50,893	181	98
2.67	Ganho	14	q11.2	20,078	211	134
2.67	Ganho	14	q21.2	61,909	565	301
2.33	Ganho	17	p13.3	79,862	1,351	822
3.00	Ganho	18	p11.32	2,255	12	8
3.67	Ganho	18	p11.32	50,878	230	129
3.50	Ganho	18	q21.2	24,280	101	61
3.00	Ganho	19	p13.3	19,220	486	288
2.33	Ganho	19	q11	12,886	222	124
2.33	Ganho	19	q13.2	17,242	716	365
3.67	Ganho	20	p12.1	741	5	4
2.67	Ganho	20	p12.1	11,895	85	48
3.00	Ganho	20	p13	13,583	130	75
10.00	Ganho	20	q11.21	905	27	13
2.67	Ganho	20	q12	24,461	285	165
3.00	Ganho	21	p11.2	38,449	304	147
2.33	Ganho	22	q11.1	5,045	85	43
2.67	Ganho	22	q11.21	1,059	29	18
2.67	Ganho	X	p22.33	68,093	417	304
3.00	Ganho	X	q13.1	83,787	559	339
1.67	Perda	4	q13.1	43,827	238	170
1.67	Perda	4	q26	26,940	82	49
1.67	Perda	4	q35.1	4,008	15	8
1.67	Perda	5	q22.3	8,933	33	18
1.67	Perda	5	q31.1	1,972	25	17

1.33	Perda	7	q36.3	1,333	8	3
1.67	Perda	9	p24.3	31,578	122	83
1.67	Perda	10	q26.3	4,622	41	19
1.67	Perda	13	q14.2	3,218	39	20
1.67	Perda	15	q11.1	69,207	731	361
1.67	Perda	15	q26.1	9,884	50	20
1.67	Perda	16	p13.3	89,895	945	561
1.67	Perda	19	p13.3	5,066	173	124
1.67	Perda	22	q11.21	29,027	437	278
	LOH	1	p32.1	968	5	2
	LOH	3	p21.31	2,946	90	64
	LOH	4	q13.1	43,873	238	170
	LOH	4	q24	85,121	327	192
	LOH	5	q11.1	131,256	848	538
	LOH	6	p21.1	128,819	654	407
	LOH	7	p22.3	54,820	343	201
	LOH	11	p11.2	4,982	51	28
	LOH	13	q11	96,018	460	240
	LOH	14	q21.1	6,977	19	12
	LOH	15	q11.2	79,645	807	406
	LOH	16	p13.3	90,074	955	567
	LOH	17	p13.3	79,862	1,351	822
	LOH	19	p13.3	5,050	173	124
	LOH	19	q12	30,322	973	512
	LOH	20	q11.21	7,307	115	63
	LOH	22	q11.1	35,159	549	337
	LOH	X	p11.22	4,253	44	33
	LOH	X	p22.13	3,205	18	11
	LOH	X	q11.1	5,691	18	12
	LOH	X	q13.1	2,988	46	30
	LOH	X	q13.2	4,874	25	19
	LOH	X	q26.2	2,721	28	15

Tabela 5 – Caso 7

Número de cópias	Tipo	Cromossomo	Citobanda de início	Tamanho(kbp)	Quantidade de Genes	OMIM® Quantidade de Genes
3.67	Ganho	1	p12	42,495	465	311
2.33	Ganho	1	p21.1	14,127	142	96
2.33	Ganho	1	p21.3	5,387	28	14
4.00	Ganho	1	p34.2	5,351	96	55
5.67	Ganho	1	p34.3	4,880	67	38
4.33	Ganho	1	p35.1	4,614	62	43
2.67	Ganho	1	p36.33	19,269	294	161
2.67	Ganho	1	q23.3	87,128	692	393
3.00	Ganho	2	p25.3	154,929	897	514
2.67	Ganho	2	q24.1	88,078	601	384
2.67	Ganho	3	p14.2	1,048	12	3
2.33	Ganho	3	p22.3	15,695	228	155
3.00	Ganho	3	p24.1	7,071	28	18
2.50	Ganho	3	p26.3	27,358	154	92
3.33	Ganho	3	q11.1	68,659	454	256
3.67	Ganho	3	q26.1	35,212	232	143
3.00	Ganho	4	p16.3	49,023	278	144
4.00	Ganho	4	q12	1,630	14	8
2.67	Ganho	4	q12	105,238	483	332
2.33	Ganho	4	q32.1	30,276	110	52
2.67	Ganho	5	p15.2	40,229	125	72
2.33	Ganho	5	p15.33	12,585	74	36
2.33	Ganho	5	q21.2	5,231	8	4
3.00	Ganho	6	p11.2	8,905	8	6
3.67	Ganho	6	p25.3	56,979	707	468
2.67	Ganho	6	q12	104,539	507	310
2.67	Ganho	7	p21.3	46,664	284	168
3.00	Ganho	7	p22.3	11,114	97	54
2.50	Ganho	7	q11.21	49,489	401	223
3.00	Ganho	7	q31.1	40,943	330	180

3.33	Ganho	7	q36.1	6,537	32	18
2.67	Ganho	8	p11.22	30,554	131	84
2.33	Ganho	8	q23.3	1,440	1	1
2.67	Ganho	8	q24.13	8,662	42	20
2.33	Ganho	8	q24.22	2,190	2	1
3.67	Ganho	9	p13.2	31,083	54	8
3.33	Ganho	9	p24.3	35,738	206	133
2.67	Ganho	9	q21.11	70,070	677	381
3.33	Ganho	10	p11.22	4,454	17	9
2.33	Ganho	10	p11.23	3,834	14	9
4.33	Ganho	10	p15.3	1,734	13	3
6.67	Ganho	10	p15.3	846	1	0
10.33	Ganho	10	p15.3	2,036	8	2
2.67	Ganho	10	q11.21	92,626	710	408
2.33	Ganho	11	p12	19,782	261	116
3.00	Ganho	11	p13	1,936	20	15
3.33	Ganho	11	p14.1	3,806	16	15
2.67	Ganho	11	p15.2	15,024	83	61
2.67	Ganho	11	q13.2	1,722	42	34
4.33	Ganho	11	q13.4	4,881	50	31
2.67	Ganho	11	q22.1	1,038	6	4
3.33	Ganho	12	p11.21	10,728	25	14
2.67	Ganho	12	p12.3	14,842	71	42
2.33	Ganho	12	p13.33	1,053	11	9
3.33	Ganho	12	p13.33	8,721	153	110
2.67	Ganho	12	q12	91,059	838	528
2.50	Ganho	14	q11.2	86,310	776	437
3.33	Ganho	14	q32.33	649	2	0
2.67	Ganho	15	q11.2	2,193	97	14
2.33	Ganho	15	q21.3	541	3	1
2.67	Ganho	15	q22.31	21,750	265	145
2.67	Ganho	15	q25.3	5,408	65	38
3.33	Ganho	15	q26.1	8,467	40	16
2.50	Ganho	16	p12.2	8,813	157	86
3.00	Ganho	16	p12.3	1,762	22	12
3.67	Ganho	16	p13.13	7,378	51	25

3.33	Ganho	16	p13.2	840	7	5
4.33	Ganho	16	p13.2	2,763	23	14
3.00	Ganho	16	p13.3	8,247	222	132
2.67	Ganho	17	p11.2	7,663	75	39
3.00	Ganho	17	p13.2	1,855	107	66
3.33	Ganho	17	q21.31	2,929	61	42
2.67	Ganho	17	q21.32	8,177	75	55
4.67	Ganho	17	q23.1	4,420	58	38
2.33	Ganho	17	q24.2	5,024	29	19
3.00	Ganho	17	q24.3	5,237	116	68
2.67	Ganho	17	q25.3	3,167	46	27
3.33	Ganho	17	q25.3	1,650	57	33
4.67	Ganho	18	p11.31	1,718	9	2
2.67	Ganho	18	p11.31	13,807	66	37
6.00	Ganho	18	p11.32	2,751	16	10
7.67	Ganho	18	p11.32	1,685	13	7
4.00	Ganho	18	q11.2	2,092	15	8
7.33	Ganho	18	q11.2	2,001	6	4
4.33	Ganho	18	q11.2	846	5	3
2.33	Ganho	18	q12.1	917	0	0
4.67	Ganho	18	q12.1	3,099	18	12
2.33	Ganho	19	p12	32,405	749	416
3.67	Ganho	19	p13.12	6,767	174	108
4.33	Ganho	19	p13.2	5,211	174	100
2.33	Ganho	20	p11.21	6,072	39	17
2.67	Ganho	20	q11.21	23,729	273	158
3.00	Ganho	20	q13.2	8,825	142	79
2.33	Ganho	21	q21.1	4,444	13	8
2.67	Ganho	21	q21.2	2,436	7	2
2.67	Ganho	21	q22.11	14,405	181	100
3.67	Ganho	21	q22.3	1,582	23	15
2.33	Ganho	22	q11.21	1,053	18	11
2.67	Ganho	22	q12.2	1,296	35	22
1.67	Perda	5	q33.3	1,183	12	9
1.67	Perda	8	p23.3	6,042	15	6
1.67	Perda	8	q13.2	2,792	11	7

1.67	Perda	8	q24.23	8,049	117	64
1.33	Perda	10	p12.2	5,397	32	20
1.67	Perda	10	p15.1	18,544	115	67
1.33	Perda	11	p15.5	13,678	288	155
1.67	Perda	13	q12.12	7,580	56	31
1.33	Perda	13	q34	1,783	27	16
1.67	Perda	15	q15.2	2,889	57	38
1.67	Perda	16	p12.3	2,609	41	21
1.67	Perda	16	q13	2,420	39	24
1.67	Perda	16	q21	17,820	197	131
1.67	Perda	17	p13.1	7,288	68	33
1.67	Perda	17	p13.3	5,930	129	82
1.33	Perda	17	q12	10,333	320	204
1.33	Perda	17	q22	1,012	16	9
1.33	Perda	17	q24.1	1,160	4	3
1.00	Perda	17	q24.1	906	7	5
1.33	Perda	20	p12.3	18,142	90	53
1.33	Perda	22	q11.1	5,378	97	50
1.33	Perda	22	q11.22	8,077	111	63
1.00	Perda	22	q12.2	2,119	22	15
1.33	Perda	22	q12.3	12,140	214	143
1.00	Perda	22	q13.31	3,223	46	29
1.67	Perda	X	p11.22	2,341	29	22
1.67	Perda	X	p22.12	4,836	28	17
	LOH	1	p21.3	7,328	38	23
	LOH	1	p33	47,785	277	161
	LOH	1	p36.13	14,358	238	136
	LOH	2	q32.3	5,262	20	12
	LOH	3	p22.3	55,675	411	252
	LOH	3	p26.3	28,271	156	94
	LOH	7	q11.1	4,288	26	7
	LOH	7	q33	2,610	30	14
	LOH	8	p23.3	5,200	15	6
	LOH	8	q11.1	2,794	8	5
	LOH	8	q13.2	56,397	251	150
	LOH	8	q24.23	8,139	117	64

	LOH	10	p15.1	25,294	151	86
	LOH	11	p15.5	42,407	424	257
	LOH	12	p13.2	8,300	94	63
	LOH	13	q11	96,018	460	240
	LOH	14	q32.31	2,647	36	22
	LOH	15	q15.2	2,507	47	32
	LOH	16	p11.2	58,573	438	273
	LOH	17	p13.3	57,901	1,033	629
	LOH	17	q23.3	17,939	273	160
	LOH	18	q12.1	3,559	5	4
	LOH	18	q12.1	46,053	193	113
	LOH	19	q13.42	5,377	256	104
	LOH	20	p13	25,176	143	76
	LOH	20	q11.22	3,335	58	39
	LOH	22	q11.1	35,159	549	337
	LOH	X	p11.22	5,728	51	34
	LOH	X	p11.3	3,733	109	86
	LOH	X	p22.11	2,600	18	11
	LOH	X	p22.13	3,818	22	14
	LOH	X	q11.1	5,738	18	12
	LOH	X	q13.1	9,899	93	57
	LOH	X	q21.33	8,484	86	45
	LOH	X	q23	2,893	13	8
	LOH	X	q23	24,477	162	99
	LOH	X	q28	3,971	109	75

Tabela 6 anexo – Caso 10

Número de cópias	Tipo	Cromossomo	Citobanda de início	Tamanho(kbp)	Quantidade de Genes	OMIM® Quantidade de Genes
2.33	Ganho	1	p36.33	14,335	220	122
2.50	Ganho	1	q21.1	8,336	200	133
2.67	Ganho	1	q24.1	8,486	97	51
3.33	Ganho	1	q31.1	1,653	1	1
2.67	Ganho	1	q31.1	11,553	35	27
2.67	Ganho	1	q41	16,979	144	76
2.67	Ganho	1	q43	7,801	93	24
2.33	Ganho	2	p23.3	3,535	64	45
2.33	Ganho	3	q13.11	55,523	381	226
3.00	Ganho	3	q25.33	26,040	132	85
3.00	Ganho	3	q28	7,504	77	39
2.67	Ganho	5	p15.33	32,963	110	58
3.00	Ganho	6	p21.32	22,316	285	199
3.33	Ganho	6	p22.3	15,621	311	206
3.33	Ganho	6	q14.1	1,696	4	4
2.67	Ganho	6	q15	18,394	55	35
2.33	Ganho	7	p12.2	46,624	249	135
2.67	Ganho	7	q21.3	9,101	160	90
2.33	Ganho	7	q36.3	3,403	20	10
2.33	Ganho	8	q22.1	3,903	29	19
3.00	Ganho	8	q22.2	47,238	277	159
2.67	Ganho	9	q31.1	1,069	7	2
3.33	Ganho	9	q34.13	2,741	49	31
2.33	Ganho	9	q34.3	3,611	119	65
2.67	Ganho	11	q13.1	42,815	382	240
2.33	Ganho	11	q22.3	6,900	62	39
2.33	Ganho	13	q13.1	7,973	46	24
2.33	Ganho	14	q11.2	29,958	233	147
2.33	Ganho	20	p11.23	10,532	87	45
2.33	Ganho	20	q12	12,815	136	80
2.33	Ganho	20	q13.31	5,638	52	28

1.33	Perda	1	p32.1	22,777	102	63
1.33	Perda	1	p36.21	20,512	323	181
1.67	Perda	2	p23.2	214,060	1,314	785
1.67	Perda	2	p25.3	25,411	119	67
1.67	Perda	3	p26.3	103,947	650	383
1.67	Perda	3	q28	644	5	5
1.33	Perda	4	q22.1	81,537	317	211
1.33	Perda	4	q33	11,926	27	18
1.67	Perda	4	q35.1	7,343	50	20
1.33	Perda	5	q11.1	52,015	245	143
1.33	Perda	5	q21.1	36,919	200	126
1.67	Perda	6	q14.1	4,700	29	18
1.33	Perda	6	q21	22,242	118	69
1.00	Perda	6	q22.33	3,495	17	9
1.33	Perda	6	q23.2	38,332	235	141
1.33	Perda	7	p22.3	49,008	340	204
1.67	Perda	7	q22.3	42,191	284	156
1.33	Perda	7	q35	7,966	87	48
1.67	Perda	8	p21.1	8,097	47	27
1.00	Perda	8	p21.3	7,962	72	54
1.00	Perda	8	p22	3,591	7	5
1.33	Perda	8	p22	2,366	16	13
1.33	Perda	8	p23.2	8,535	108	35
1.00	Perda	8	p23.3	4,720	15	6
1.33	Perda	10	p15.3	711	4	2
1.67	Perda	10	p15.3	42,699	213	113
1.33	Perda	10	q11.21	32,421	226	127
1.67	Perda	10	q22.2	59,448	479	280
1.67	Perda	11	p14.1	4,810	18	16
1.67	Perda	11	p15.5	24,777	357	205
1.67	Perda	11	q11	10,471	307	167
1.67	Perda	11	q23.3	13,418	173	109
0.67	Perda	11	q24.3	5,182	26	15
1.67	Perda	12	p13.33	110,144	954	625
1.33	Perda	12	q24.11	15,123	178	115
1.67	Perda	12	q24.33	852	10	6

0.67	Perda	12	q24.33	1,178	19	10
1.33	Perda	13	q14.11	74,796	317	163
1.33	Perda	14	q23.1	7,233	50	32
1.00	Perda	14	q23.3	4,694	45	27
1.33	Perda	14	q24.2	30,312	307	148
1.67	Perda	14	q32.31	4,786	66	36
1.67	Perda	15	q11.1	13,806	175	40
1.33	Perda	15	q14	23,872	233	139
1.67	Perda	15	q21.3	44,525	418	230
1.67	Perda	16	p12.2	12,401	183	97
1.33	Perda	16	q11.2	30,834	295	196
1.67	Perda	16	q24.2	1,580	50	30
1.33	Perda	17	p13.3	49,759	963	588
1.67	Perda	17	q21.33	30,079	391	235
1.67	Perda	18	p11.32	7,087	42	20
1.33	Perda	19	q12	28,989	968	511
1.67	Perda	20	p12.1	3,314	31	15
1.33	Perda	20	q11.21	8,273	104	60
1.33	Perda	21	p11.2	30,703	181	79
1.67	Perda	22	q11.1	2,574	29	11
1.67	Perda	22	q11.22	6,649	86	47
1.67	Perda	22	q12.2	8,759	133	96
1.67	Perda	22	q13.31	1,887	6	0
1.00	Perda	22	q13.33	1,036	38	29
1.33	Perda	X	p22.33	47,684	242	175
1.33	Perda	X	q13.3	28,137	92	61
	LOH	1	p36.21	68,446	715	414
	LOH	1	q21.2	37,919	594	386
	LOH	1	q32.1	15,119	132	96
	LOH	1	q42.3	4,839	18	11
	LOH	2	p23.3	215,176	1,324	792
	LOH	2	p25.3	25,475	120	68
	LOH	3	p26.3	103,914	650	383
	LOH	3	q13.13	5,624	42	22
	LOH	3	q21.3	14,085	112	63
	LOH	3	q25.2	5,181	29	15

	LOH	3	q27.2	4,952	43	30
	LOH	4	q21.3	102,980	405	254
	LOH	5	q11.1	131,256	848	538
	LOH	6	p25.3	16,510	98	57
	LOH	6	q14.2	3,957	23	15
	LOH	6	q21	64,349	371	220
	LOH	7	p22.3	49,008	340	204
	LOH	7	q22.3	50,227	369	203
	LOH	8	p23.3	36,489	264	141
	LOH	10	p15.3	135,308	921	521
	LOH	11	p15.5	32,239	384	228
	LOH	11	q11	16,880	452	271
	LOH	11	q23.1	23,123	234	148
	LOH	12	p13.33	133,629	1,185	764
	LOH	13	q13.3	75,012	319	164
	LOH	14	q23.1	47,277	466	241
	LOH	15	q11.2	79,645	807	406
	LOH	16	p13.3	35,188	535	295
	LOH	16	q11.2	30,912	296	197
	LOH	17	p13.3	79,862	1,351	822
	LOH	18	p11.32	7,405	43	20
	LOH	19	q12	28,921	966	509
	LOH	20	q11.22	8,187	104	60
	LOH	21	q11.2	33,753	295	145
	LOH	22	q11.22	16,863	255	166
	LOH	X	p22.33	48,260	258	189
	LOH	X	q11.1	5,691	18	12
	LOH	X	q13.3	28,308	93	62
	LOH	X	q23	2,878	16	9

Tabela 7 anexo – Caso 15

Número de cópias	Tipo	Cromossomo	Citobanda de início	Tamanho(kbp)	Quantidade de Genes	OMIM® Quantidade de Genes
2.67	Ganho	1	q21.3	33,682	420	263
3.00	Ganho	1	q42.12	22,723	204	83
2.33	Ganho	2	q31.2	36,755	193	118
2.67	Ganho	3	q11.2	42,193	293	163
2.67	Ganho	3	q25.31	41,236	266	163
2.33	Ganho	4	q33	19,260	76	37
2.67	Ganho	5	q31.3	33,075	231	149
2.50	Ganho	6	p22.3	31,895	552	373
3.00	Ganho	6	p25.3	18,315	109	63
2.33	Ganho	8	q23.3	548	1	1
2.67	Ganho	8	q24.21	18,946	156	82
2.33	Ganho	9	p21.2	1,224	7	3
2.33	Ganho	9	p21.3	1,518	5	4
2.33	Ganho	9	q34.3	2,090	91	49
2.33	Ganho	14	q12	1,272	2	0
2.33	Ganho	14	q21.1	2,257	1	1
2.67	Ganho	15	q22.2	2,152	9	7
2.67	Ganho	16	p13.13	44,046	337	179
2.67	Ganho	17	p13.3	980	15	10
2.33	Ganho	17	q24.2	8,354	82	51
2.67	Ganho	17	q25.3	4,043	93	56
2.33	Ganho	19	q11	1,222	1	0
2.33	Ganho	19	q13.11	783	14	7
2.33	Ganho	19	q13.11	1,076	38	21
2.67	Ganho	20	p13	3,646	77	43
2.33	Ganho	20	q11.22	1,322	22	13
1.33	Perda	1	p36.12	2,306	29	15
1.33	Perda	2	p21	1,389	12	7
1.67	Perda	2	p25.3	4,914	21	13
1.67	Perda	3	p24.3	18,457	90	66

1.67	Perda	4	p12	4,332	20	11
1.67	Perda	4	p15.31	22,793	77	43
1.67	Perda	4	p16.3	3,385	62	37
1.67	Perda	4	q13.2	2,817	43	30
1.33	Perda	5	q12.1	31,662	162	94
1.33	Perda	6	q16.1	14,612	66	40
1.33	Perda	6	q23.3	34,304	201	118
1.67	Perda	8	p23.3	43,512	326	188
1.67	Perda	8	q21.12	29,974	147	89
1.67	Perda	12	p13.33	28,703	308	215
1.50	Perda	13	q11	96,018	460	240
1.67	Perda	14	q21.3	59,065	554	297
1.33	Perda	15	q23	19,395	213	113
1.50	Perda	16	p13.3	11,534	246	148
1.33	Perda	16	q22.2	17,107	146	90
1.33	Perda	17	p13.3	41,391	802	477
1.67	Perda	19	p13.3	7,291	227	161
1.67	Perda	19	q13.2	17,200	713	363
1.33	Perda	21	q22.11	2,842	37	21
1.33	Perda	21	q22.13	10,143	139	82
1.67	Perda	22	q11.1	35,159	549	337
1.67	Perda	X	p11.22	21,926	149	92
1.67	Perda	X	p22.33	28,107	156	114
1.67	Perda	X	q21.1	53,846	255	159
	LOH	1	q31.1	61,312	485	274
	LOH	2	p25.3	90,224	564	343
	LOH	3	p26.3	197,789	1,279	761
	LOH	4	p12	4,332	20	11
	LOH	4	p16.3	42,687	253	131
	LOH	5	q12.1	32,226	162	94
	LOH	5	q35.3	3,768	65	30
	LOH	6	q16.1	74,732	402	239
	LOH	7	p22.3	57,970	380	222
	LOH	8	p23.3	43,579	326	188
	LOH	8	q21.12	30,217	148	90
	LOH	12	p13.33	28,599	308	215

	LOH	13	q11	96,018	460	240
	LOH	14	q21.3	59,686	555	298
	LOH	15	q22.2	40,536	395	215
	LOH	16	p13.3	11,726	249	150
	LOH	16	q12.2	34,518	372	240
	LOH	17	p13.3	79,862	1,351	822
	LOH	18	p11.32	77,995	343	198
	LOH	19	p13.3	7,421	233	165
	LOH	19	q13.2	17,316	718	366
	LOH	21	q22.11	3,223	38	21
	LOH	21	q22.13	10,143	139	82
	LOH	22	q11.1	35,159	549	337
	LOH	X	p22.33	155,041	1,019	669

Tabela 8 anexo – Caso 17

Número de cópias	Tipo	Cromossomo	Citobanda de início	Tamanho(kbp)	Quantidade de Genes	OMIM® Quantidade de Genes
2.50	Ganho	1	p32.3	2,824	28	15
4.00	Ganho	1	p32.3	1,429	24	11
3.00	Ganho	1	p32.3	30,089	138	82
4.00	Ganho	1	p35.2	900	17	9
3.00	Ganho	1	p35.2	18,681	269	160
2.50	Ganho	1	q21.2	84,111	941	614
3.00	Ganho	1	q42.2	15,425	132	45
3.00	Ganho	2	p25.3	65,802	381	229
2.50	Ganho	2	q11.2	756	8	5
3.00	Ganho	3	p21.31	41,967	315	190
3.00	Ganho	3	q13.31	1,035	3	3
3.00	Ganho	3	q22.3	12,318	73	46
4.00	Ganho	3	q25.1	47,783	311	185
2.50	Ganho	4	p16.3	2,398	48	27
2.50	Ganho	5	p15.1	20,935	60	33
2.50	Ganho	5	q23.2	20,543	248	180
2.50	Ganho	5	q35.2	4,861	93	50
3.00	Ganho	6	p22.3	3,472	9	5
3.00	Ganho	6	q22.1	35,832	201	123
5.00	Ganho	6	q25.1	1,493	9	5
3.00	Ganho	6	q25.2	13,805	72	40
4.00	Ganho	6	q27	3,993	34	19
3.00	Ganho	7	p15.1	2,431	30	16
3.00	Ganho	7	q31.1	12,882	39	26
3.00	Ganho	8	q11.21	20,052	97	56
5.00	Ganho	8	q13.3	7,637	31	18
4.00	Ganho	8	q21.12	9,952	42	24
5.00	Ganho	8	q21.3	22,228	117	74
6.00	Ganho	8	q23.2	17,235	65	36
5.00	Ganho	8	q24.21	17,536	151	80
3.00	Ganho	9	p21.3	2,380	4	3

4.00	Ganho	9	q34.3	2,872	106	61
3.00	Ganho	10	q11.22	2,896	31	12
2.50	Ganho	11	p13	23,001	151	73
2.50	Ganho	12	p12.1	36,813	400	258
2.50	Ganho	12	q14.2	8,892	63	44
3.00	Ganho	12	q24.31	916	9	4
3.00	Ganho	14	q24.1	1,305	12	6
3.00	Ganho	14	q32.33	746	4	0
2.50	Ganho	15	q14	410	4	1
2.50	Ganho	15	q26.1	772	12	5
2.50	Ganho	16	p13.2	26,038	305	158
3.00	Ganho	17	p13.3	6,942	182	112
3.00	Ganho	17	q25.3	3,560	86	52
3.00	Ganho	18	p11.32	6,044	37	18
2.50	Ganho	18	q12.2	5,100	7	2
2.50	Ganho	19	p13.2	14,335	352	206
2.50	Ganho	19	q13.13	13,816	525	322
2.50	Ganho	20	p13	13,986	134	78
2.50	Ganho	20	q11.21	15,788	238	129
3.00	Ganho	20	q13.12	4,569	41	25
4.00	Ganho	20	q13.2	12,486	151	85
4.00	Ganho	22	q11.1	7,656	131	68
2.50	Ganho	X	p21.2	13,026	45	29
1.00	Perda	1	p36.33	30,454	470	265
1.00	Perda	2	q37.1	7,747	79	43
1.50	Perda	3	p25.1	6,861	24	12
1.00	Perda	4	q12	128,865	560	361
1.00	Perda	5	q12.3	58,786	243	143
1.00	Perda	6	p12.3	12,103	73	47
1.00	Perda	6	p22.1	15,831	387	256
1.00	Perda	7	p22.3	28,689	193	119
1.00	Perda	7	q11.22	18,450	129	71
1.00	Perda	8	p23.3	39,951	299	165
1.50	Perda	10	p15.3	35,495	195	108
1.00	Perda	11	p15.5	17,478	309	174
1.50	Perda	11	q12.1	6,184	151	75

1.00	Perda	11	q13.5	59,455	441	259
1.00	Perda	12	p13.33	23,833	278	199
1.50	Perda	12	q24.11	2,364	33	24
1.50	Perda	13	q11	27,971	199	100
1.00	Perda	13	q14.13	26,328	93	50
1.50	Perda	13	q22.1	37,035	128	69
1.50	Perda	15	q11.1	7,133	136	23
1.50	Perda	15	q15.2	2,868	54	34
1.00	Perda	16	p13.3	4,069	190	113
1.00	Perda	16	q21	27,106	299	191
1.00	Perda	17	p13.1	19,490	238	131
1.00	Perda	17	q11.2	10,344	164	102
1.00	Perda	17	q12	7,271	238	141
1.00	Perda	17	q21.32	25,898	264	170
1.50	Perda	17	q25.1	3,069	73	42
1.50	Perda	18	q21.1	11,121	60	38
1.00	Perda	18	q22.2	10,047	40	21
1.00	Perda	19	p13.3	9,932	305	205
1.00	Perda	19	q13.42	4,212	163	76
1.00	Perda	21	p11.2	24,215	118	39
1.00	Perda	22	q11.23	27,475	418	269
1.00	Perda	X	p22.33	23,910	139	106
1.00	Perda	X	q25	33,343	294	181
	LOH	1	p36.33	31,143	481	271
	LOH	2	p16.1	2,608	23	13
	LOH	2	q37.1	7,816	79	43
	LOH	3	p21.31	2,768	78	51
	LOH	3	p26.3	44,830	268	166
	LOH	3	q13.11	3,595	21	12
	LOH	4	q12	132,765	566	363
	LOH	5	q13.2	55,139	220	129
	LOH	6	p22.3	35,522	589	399
	LOH	6	p24.1	5,686	25	16
	LOH	7	p22.3	28,927	193	119
	LOH	7	q11.22	19,890	131	73
	LOH	8	p23.3	40,465	300	165

	LOH	10	p15.3	36,351	199	110
	LOH	10	q25.3	3,159	20	15
	LOH	11	p15.5	18,041	318	180
	LOH	11	q12.1	3,869	81	43
	LOH	11	q13.3	66,390	535	319
	LOH	12	p13.33	23,992	278	199
	LOH	12	q24.11	3,064	39	30
	LOH	13	q11	96,018	460	240
	LOH	15	q24.1	3,641	61	41
	LOH	16	p13.3	4,680	207	123
	LOH	16	q21	27,542	299	191
	LOH	17	p13.3	21,817	399	228
	LOH	17	q11.1	54,936	952	594
	LOH	18	q12.3	16,702	89	54
	LOH	18	q22.2	9,955	39	20
	LOH	19	p13.3	9,693	300	202
	LOH	19	q13.42	4,382	173	84
	LOH	21	p11.2	24,609	125	41
	LOH	22	q11.23	27,629	421	270
	LOH	X	p11.22	3,409	40	29
	LOH	X	p22.33	23,927	139	106
	LOH	X	q13.3	2,527	9	6
	LOH	X	q21.32	61,983	482	291

Tabela 9 anexo – Caso 19

Número de cópias	Tipo	Cromossomo	Citobanda de início	Tamanho(kbp)	Quantidade de Genes	OMIM® Quantidade de Genes
2.50	Ganho	2	p23.3	12,906	121	77
2.50	Ganho	2	p25.3	24,632	111	62
3.00	Ganho	2	q32.2	1,158	14	9
3.00	Ganho	2	q34	29,257	252	153
3.00	Ganho	4	p15.33	24,982	64	37
4.00	Ganho	4	p16.3	13,546	151	73
2.50	Ganho	5	q23.1	25,992	255	184
2.50	Ganho	6	p21.33	2,620	140	103
3.00	Ganho	8	q11.23	3,952	24	16
3.00	Ganho	8	q21.13	1,497	7	4
4.00	Ganho	8	q21.13	22,117	124	71
5.00	Ganho	8	q22.3	11,436	23	19
6.00	Ganho	8	q23.3	19,323	91	49
5.00	Ganho	8	q24.22	8,915	39	22
4.00	Ganho	8	q24.3	2,166	84	44
3.00	Ganho	9	q22.33	39,405	476	276
2.50	Ganho	10	q24.31	3,114	68	46
3.00	Ganho	11	q12.1	42,914	552	353
3.00	Ganho	12	p13.33	25,385	286	202
3.00	Ganho	14	q32.2	5,558	162	59
2.50	Ganho	15	q14	2,940	16	5
2.50	Ganho	15	q22.31	8,173	87	51
3.00	Ganho	16	q23.1	647	2	2
3.00	Ganho	17	q12	1,306	38	28
2.50	Ganho	17	q21.31	8,500	180	125
2.50	Ganho	17	q22	23,583	312	188
3.00	Ganho	17	q25.3	1,390	59	35
2.50	Ganho	19	p13.11	2,893	35	15
2.50	Ganho	20	p11.21	3,079	35	21
1.00	Perda	1	p36.31	31,757	469	274
1.00	Perda	3	p26.3	41,898	233	149

1.00	Perda	3	q27.3	11,368	106	58
1.00	Perda	4	q21.23	55,371	212	148
1.00	Perda	4	q31.21	13,561	60	40
1.00	Perda	5	q23.1	1,843	7	2
1.00	Perda	6	p21.1	128,833	654	407
1.00	Perda	7	p22.3	26,238	164	99
1.00	Perda	9	p24.3	43,908	257	146
1.00	Perda	10	q25.1	28,233	167	93
1.00	Perda	11	p15.5	31,135	377	222
1.00	Perda	11	q24.1	11,338	101	51
1.00	Perda	12	q21.31	47,435	398	233
1.00	Perda	13	q13.2	80,387	347	179
1.00	Perda	14	q23.1	13,097	105	67
1.50	Perda	16	p13.3	3,994	25	17
1.00	Perda	16	q21	12,771	177	118
1.00	Perda	17	p13.1	27,397	339	192
1.00	Perda	19	p13.3	8,786	277	194
1.00	Perda	19	q11	31,339	974	512
1.50	Perda	21	q21.1	30,355	281	138
1.00	Perda	22	q11.1	4,874	82	42
1.00	Perda	22	q11.22	28,140	426	273
1.00	Perda	X	p22.33	155,041	1,019	669
	LOH	1	p36.31	32,194	473	277
	LOH	1	q22	2,629	67	44
	LOH	2	p23.3	1,898	18	12
	LOH	3	p21.31	3,638	111	72
	LOH	3	p26.3	42,076	234	150
	LOH	3	q27.3	11,383	106	58
	LOH	4	q21.23	70,192	281	192
	LOH	5	q23.1	64,017	553	363
	LOH	6	p25.3	170,708	1,220	782
	LOH	7	p22.3	27,247	188	116
	LOH	7	q31.31	3,806	8	7
	LOH	9	p24.3	38,979	237	148
	LOH	10	q25.1	29,620	194	105
	LOH	11	p11.2	4,347	37	19

	LOH	11	p15.5	31,297	379	224
	LOH	11	q24.1	11,656	103	52
	LOH	12	q21.31	48,048	400	235
	LOH	13	q13.2	80,392	347	179
	LOH	14	q23.1	13,216	105	67
	LOH	16	p13.3	3,980	25	17
	LOH	16	q21	13,097	178	118
	LOH	17	p13.3	79,862	1,351	822
	LOH	19	p13.3	9,114	284	196
	LOH	19	q11	31,339	974	512
	LOH	21	q21.1	30,316	281	138
	LOH	22	q11.1	35,159	549	337
	LOH	X	p22.33	155,041	1,019	669

Tabela 10 anexo – Caso 20

Número de cópias	Tipo	Cromossomo	Citobanda de início	Tamanho(kbp)	Quantidade de Genes	OMIM® Quantidade de Genes
3.00	Ganho	1	p13.3	60,251	656	435
3.00	Ganho	1	p36.33	107,177	1,075	621
4.00	Ganho	1	q24.2	79,811	634	357
3.00	Ganho	2	p25.3	233,699	1,393	835
2.50	Ganho	2	q37.1	1,304	25	19
3.00	Ganho	2	q37.1	7,371	66	33
3.00	Ganho	3	p26.3	197,789	1,279	761
3.00	Ganho	5	p15.33	180,660	1,035	639
3.00	Ganho	7	p22.3	159,077	1,140	642
10.00	Ganho	8	p11.21	655	7	6
3.00	Ganho	8	p11.21	1,672	16	14
8.00	Ganho	8	p11.23	1,113	17	13
3.00	Ganho	8	q11.23	3,530	18	14
6.00	Ganho	8	q24.13	20,733	165	87
3.00	Ganho	10	p15.3	135,308	921	521
3.00	Ganho	11	q12.2	11,219	321	227
4.00	Ganho	11	q13.4	7,416	81	51
3.00	Ganho	11	q14.1	5,290	11	4
4.00	Ganho	11	q14.1	3,608	21	12
3.00	Ganho	11	q14.3	7,686	61	27
3.00	Ganho	11	q22.1	4,611	29	19
3.00	Ganho	11	q23.1	9,305	108	79
3.00	Ganho	11	q24.1	5,801	74	35
4.00	Ganho	11	q24.3	3,660	19	12
3.00	Ganho	11	q25	2,522	15	9
3.00	Ganho	12	p13.33	133,629	1,185	764
3.00	Ganho	19	p12	1,827	19	6

4.00	Ganho	19	p13.2	1,528	65	43
3.00	Ganho	19	p13.2	1,533	55	30
4.00	Ganho	19	p13.2	4,730	125	73
3.00	Ganho	19	p13.3	2,501	55	39
5.00	Ganho	19	q11	4,550	15	7
3.00	Ganho	19	q12	26,774	959	505
3.00	Ganho	21	p11.2	35,750	241	117
4.00	Ganho	21	q22.3	2,689	63	30
1.00	Perda	8	p11.22	1,881	9	7
1.00	Perda	8	p23.3	37,814	275	149
1.00	Perda	8	q21.11	10,263	35	20
1.50	Perda	13	q14.3	2,032	22	12
1.50	Perda	13	q22.1	1,741	6	4
1.50	Perda	13	q32.1	19,900	112	59
1.50	Perda	15	q14	1,842	39	24
1.00	Perda	15	q24.1	1,447	30	16
1.00	Perda	19	p13.11	2,194	44	28
1.00	Perda	19	p13.2	2,458	77	42
1.00	Perda	19	p13.3	4,734	172	123
1.00	Perda	22	q11.1	35,159	549	337
1.00	Perda	X	p22.33	155,041	1,019	669
	LOH	1	q21.1	3,821	50	26
	LOH	6	p25.3	170,708	1,220	782
	LOH	7	q11.1	5,709	42	15
	LOH	8	p23.3	37,955	280	154
	LOH	8	q21.11	50,954	228	139
	LOH	11	p11.2	5,296	58	31
	LOH	11	q13.2	3,553	83	68
	LOH	13	q11	96,018	460	240
	LOH	14	q11.2	87,063	778	437

	LOH	15	q11.2	79,645	807	406
	LOH	17	p13.3	79,862	1,351	822
	LOH	19	p13.2	2,709	88	48
	LOH	19	p13.3	4,754	172	123
	LOH	22	q11.1	35,159	549	337
	LOH	X	p22.33	155,041	1,019	669

Tabela 11 anexo – Caso 25

Número de cópias	Tipo	Cromossomo	Citobanda de início	Tamanho(kb p)	Quantidade de Genes	OMIM® Quantidade de Genes
3.00	Ganho	1	p35.1	10,732	155	99
3.00	Ganho	1	p36.33	4,283	97	48
3.00	Ganho	1	q21.1	7,739	176	117
3.00	Ganho	1	q22	9,729	187	127
3.00	Ganho	5	p15.2	32,324	111	62
4.00	Ganho	5	p15.33	11,196	73	36
3.00	Ganho	6	p11.2	5,288	2	1
3.00	Ganho	6	p22.1	2,357	97	58
4.00	Ganho	6	p22.3	11,527	147	103
3.00	Ganho	6	p24.1	4,423	21	12
4.00	Ganho	6	p25.1	8,951	49	28
3.00	Ganho	6	p25.3	4,064	34	19
3.00	Ganho	7	p14.1	10,344	76	50
3.00	Ganho	7	q33	23,599	220	108
3.00	Ganho	10	p13	14,933	91	56
3.00	Ganho	10	p15.3	7,073	48	22
3.00	Ganho	12	p13.33	28,038	307	215
3.00	Ganho	14	q32.2	2,556	115	34
3.00	Ganho	15	q21.2	3,003	10	7
3.00	Ganho	15	q22.2	8,188	90	54
4.00	Ganho	15	q23	14,946	191	103
3.00	Ganho	15	q25.3	7,967	71	39
4.00	Ganho	15	q26.1	4,545	10	2
3.00	Ganho	15	q26.2	4,049	31	14
3.00	Ganho	17	q21.33	17,054	171	108
3.00	Ganho	19	q11	16,603	333	193
3.00	Ganho	20	p12.2	5,438	14	8
4.00	Ganho	20	p12.3	3,054	11	7
3.00	Ganho	20	p13	8,524	115	67
3.00	Ganho	20	q13.13	14,529	174	102

2.50	Ganho	21	q21.1	3,903	12	7
2.50	Ganho	X	p21.1	1,537	12	8
1.00	Perda	1	p31.3	33,115	173	102
1.00	Perda	1	p36.11	9,149	157	88
1.00	Perda	2	q37.3	3,622	52	27
1.00	Perda	4	q22.1	35,514	165	120
1.00	Perda	4	q31.23	18,082	75	42
1.00	Perda	4	q34.1	18,685	75	37
1.00	Perda	5	q11.2	62,249	279	165
1.00	Perda	6	p21.33	20,944	328	228
1.00	Perda	6	q14.1	90,811	464	280
1.00	Perda	7	p22.3	24,867	156	94
1.00	Perda	8	p23.3	19,471	145	59
1.00	Perda	8	q24.3	1,485	61	35
1.00	Perda	9	p24.3	31,537	122	83
1.00	Perda	10	p12.1	10,356	43	24
1.50	Perda	10	p14	4,950	18	10
1.00	Perda	11	p15.5	44,999	443	264
1.00	Perda	11	q23.3	16,754	172	102
1.00	Perda	12	q24.21	18,973	178	101
1.00	Perda	13	q11	96,018	460	240
1.00	Perda	14	q11.2	59,673	435	279
1.00	Perda	15	q21.3	7,132	44	29
1.00	Perda	17	p13.2	42,842	816	492
1.00	Perda	17	q24.2	14,773	246	146
1.00	Perda	19	p13.2	2,142	59	33
1.00	Perda	21	q21.1	13,398	94	28
1.00	Perda	21	q22.11	7,551	64	40
0.00	Perda	21	q22.3	1,355	20	12
1.00	Perda	21	q22.3	3,897	80	43
1.00	Perda	22	q12.3	14,500	251	163
1.00	Perda	X	p11.22	104,665	695	429
1.00	Perda	X	p22.33	37,078	177	127
	LOH	1	p31.3	33,712	175	104
	LOH	1	p36.33	35,798	554	314
	LOH	2	p23.3	2,599	59	41

	LOH	2	q37.3	3,939	58	31
	LOH	4	q21.3	36,521	171	125
	LOH	4	q31.23	18,237	75	42
	LOH	4	q34.1	18,861	75	37
	LOH	5	q11.2	63,168	288	172
	LOH	6	p22.1	25,439	482	318
	LOH	6	p25.1	10,726	60	33
	LOH	6	q14.1	91,056	466	281
	LOH	7	p22.3	25,279	159	95
	LOH	8	p23.3	19,687	147	61
	LOH	8	q11.1	2,710	7	5
	LOH	9	p24.3	31,626	122	83
	LOH	10	p12.1	11,533	50	26
	LOH	10	p14	5,953	25	12
	LOH	11	p15.5	45,542	445	266
	LOH	11	q23.3	16,980	178	108
	LOH	12	q24.21	18,430	175	99
	LOH	13	q11	96,018	460	240
	LOH	14	q11.2	79,101	551	346
	LOH	14	q32.32	3,632	51	26
	LOH	15	q21.3	47,258	437	242
	LOH	16	p11.2	3,908	28	7
	LOH	17	p13.3	79,862	1,351	822
	LOH	19	p13.3	13,791	442	289
	LOH	19	q13.12	2,859	73	33
	LOH	19	q13.31	14,744	642	319
	LOH	21	q21.1	27,307	269	131
	LOH	22	q12.2	2,959	63	40
	LOH	22	q12.3	14,402	250	162
	LOH	X	p22.33	155,041	1,019	669

Tabela 12 anexo – Caso 27

Número de cópias	Tipo	Cromossomo	Citobanda de início	Tamanho(kbp)	Quantidade de Genes	OMIM® Quantidade de Genes
2.67	Ganho	2	p25.3	48,424	301	184
2.50	Ganho	2	q24.1	6,879	32	24
2.33	Ganho	3	q11.1	13,122	59	23
2.33	Ganho	3	q24	14,002	79	46
2.33	Ganho	3	q26.1	15,094	49	29
2.67	Ganho	3	q26.32	19,340	183	115
2.33	Ganho	5	q35.2	5,683	104	54
2.67	Ganho	6	p22.3	35,059	585	397
2.67	Ganho	6	q12	14,925	49	35
2.33	Ganho	7	p22.3	4,973	49	30
2.33	Ganho	7	q31.1	45,255	344	189
2.67	Ganho	8	q22.3	41,621	235	133
2.33	Ganho	9	p24.3	25,874	108	78
2.67	Ganho	9	q31.3	28,279	418	240
2.33	Ganho	11	p11.2	6,894	21	2
3.00	Ganho	12	p13.33	32,142	329	222
2.33	Ganho	12	q13.13	2,908	94	60
2.33	Ganho	12	q14.1	3,648	8	6
2.33	Ganho	12	q21.31	8,898	28	15
2.33	Ganho	14	q11.2	1,783	61	31
2.33	Ganho	14	q23.3	964	2	1
2.33	Ganho	15	q14	2,411	7	1
2.67	Ganho	15	q25.3	15,440	107	54
2.33	Ganho	16	p13.3	3,250	173	102
2.67	Ganho	16	q24.1	1,840	20	9
2.67	Ganho	16	q24.3	1,064	33	19
2.33	Ganho	19	p12	4,906	1	0
2.33	Ganho	19	p13.11	5,742	121	74
2.33	Ganho	19	p13.2	2,417	81	48
3.33	Ganho	19	p13.2	3,770	98	53

2.33	Ganho	19	q13.11	1,372	14	8
2.67	Ganho	20	p12.1	10,016	79	48
2.33	Ganho	20	p13	15,619	136	79
2.33	Ganho	20	q13.12	12,219	94	57
2.33	Ganho	20	q13.33	3,087	89	51
3.33	Ganho	X	q13.3	12,114	35	25
1.33	Perda	1	p36.33	34,755	541	303
1.67	Perda	2	q24.3	19,837	127	91
1.67	Perda	2	q32.1	6,047	35	24
1.67	Perda	2	q33.1	8,534	77	41
1.67	Perda	2	q36.1	15,204	119	75
1.33	Perda	4	p16.3	45,804	255	134
1.33	Perda	4	q13.3	11,542	89	61
1.33	Perda	4	q31.23	40,199	163	85
1.33	Perda	5	q11.1	63,909	280	166
1.67	Perda	5	q34	9,734	47	27
1.33	Perda	6	q16.2	8,156	24	16
1.33	Perda	8	p23.3	32,401	257	139
1.33	Perda	9	p21.2	6,076	19	9
1.33	Perda	9	q21.31	15,347	109	55
1.33	Perda	11	p15.5	38,039	422	256
1.33	Perda	12	q24.31	9,852	71	33
1.33	Perda	13	q21.1	55,899	187	101
1.33	Perda	14	q24.2	35,555	374	183
1.67	Perda	16	q23.2	2,328	8	5
1.33	Perda	17	p13.3	29,557	494	281
1.67	Perda	17	q21.32	32,129	395	248
1.33	Perda	18	q12.1	47,698	196	116
1.33	Perda	19	p13.3	10,886	349	235
1.33	Perda	19	q13.12	21,976	849	440
1.33	Perda	21	p11.2	38,449	304	147

1.33	Perda	22	q11.1	35,159	549	337
1.67	Perda	X	p22.33	19,943	117	92
1.33	Perda	X	q23	11,791	61	40
	LOH	1	p36.33	36,249	566	322
	LOH	2	q11.1	5,112	65	30
	LOH	2	q24.3	79,154	564	356
	LOH	3	p21.31	5,699	139	98
	LOH	4	p16.3	46,181	260	135
	LOH	4	q13.3	12,927	93	63
	LOH	4	q31.23	41,112	163	85
	LOH	5	q11.1	131,256	848	538
	LOH	6	q14.1	88,884	457	275
	LOH	8	p23.3	34,363	262	140
	LOH	9	p21.2	6,388	20	10
	LOH	9	q21.31	16,665	119	59
	LOH	11	p11.2	7,506	43	4
	LOH	11	p15.5	38,593	422	256
	LOH	12	q24.31	10,125	78	39
	LOH	13	q21.1	56,442	187	101
	LOH	14	q24.2	36,060	376	184
	LOH	16	p11.2	15,144	25	8
	LOH	17	p13.3	79,862	1,351	822

	LOH	18	q12.1	49,382	213	127
	LOH	19	p13.3	10,964	350	236
	LOH	19	q13.12	22,053	850	440
	LOH	21	p11.2	38,449	304	147
	LOH	22	q11.1	35,159	549	337
	LOH	X	p11.22	2,687	29	20
	LOH	X	p22.31	13,343	85	62
	LOH	X	q11.1	6,019	19	12
	LOH	X	q23	41,607	360	222

Tabela 13 anexo – Caso 28

Número de cópias	Tipo	Cromossomo	Citobanda de início	Tamanho(kbp)	Quantidade de Genes	OMIM® Quantidade de Genes
3.00	Ganho	1	p32.1	117,884	981	625
3.00	Ganho	1	p36.33	58,321	828	471
5.00	Ganho	1	q25.2	56,414	429	277
6.00	Ganho	1	q42.2	10,542	58	33
8.00	Ganho	1	q44	1,020	3	2
4.00	Ganho	1	q44	2,986	68	8
3.00	Ganho	2	p25.3	243,031	1,497	897
	LOH	3	p21.31	2,946	90	64
4.00	Ganho	3	p26.3	166,305	1,051	621
5.00	Ganho	3	q26.1	31,461	228	140
23.00	Ganho	4	p16.3	1,341	28	17
12.00	Ganho	4	p16.3	435	10	8
4.00	Ganho	4	p16.3	1,648	19	10
4.00	Ganho	5	p15.33	46,363	187	101
	LOH	5	q11.1	131,256	848	538
3.00	Ganho	6	p12.3	9,403	61	40
	LOH	6	p21.1	7,477	85	56
3.00	Ganho	6	p25.3	42,456	572	380
	LOH	6	q11.1	109,027	512	314
4.00	Ganho	7	p14.3	6,279	35	17
3.00	Ganho	7	q11.1	36,668	224	122
6.00	Ganho	7	q21.3	3,962	107	65
4.00	Ganho	7	q22.1	17,087	99	56
3.00	Ganho	7	q31.31	4,075	15	11
4.00	Ganho	7	q31.32	34,845	311	165
	LOH	8	p23.3	116,097	618	367
2.50	Ganho	8	q23.1	2,346	7	6
3.00	Ganho	8	q23.3	28,619	212	114
	LOH	10	p15.3	123,998	827	476
3.00	Ganho	10	q26.2	2,629	8	4

1.00	Perda	10	q26.3	4,622	41	19
	LOH	10	q26.3	4,612	41	19
	LOH	11	p11.2	8,599	52	22
4.00	Ganho	11	p15.5	57,922	596	325
6.00	Ganho	11	q12.1	1,700	35	14
4.00	Ganho	11	q12.1	3,431	111	75
3.00	Ganho	11	q13.5	59,729	446	263
4.00	Ganho	12	p13.33	48,923	395	263
6.00	Ganho	12	q13.12	6,374	163	109
4.00	Ganho	12	q13.2	2,035	78	52
5.00	Ganho	12	q13.3	7,149	44	30
8.00	Ganho	12	q14.2	9,097	54	39
3.00	Ganho	12	q21.1	59,030	437	261
	LOH	13	q11	96,018	460	240
3.00	Ganho	13	q11	96,018	460	240
3.00	Ganho	14	q11.2	19,284	201	133
	LOH	14	q21.1	6,527	18	12
3.00	Ganho	14	q21.2	61,909	565	301
	LOH	15	q11.2	67,413	724	367
3.00	Ganho	15	q26.1	2,558	45	28
	LOH	15	q26.1	10,970	59	26
	LOH	16	p11.2	2,258	9	0
	LOH	17	p13.3	79,862	1,351	822
3.00	Ganho	17	p13.3	79,862	1,351	822
4.00	Ganho	18	p11.32	2,708	16	10
5.00	Ganho	18	p11.32	75,212	328	189
4.00	Ganho	19	p13.2	12,502	280	160
	LOH	19	p13.3	6,060	197	140
3.00	Ganho	19	p13.3	7,194	211	131
3.00	Ganho	19	q11	8,746	106	62
3.00	Ganho	19	q13.12	21,852	846	438
3.00	Ganho	20	p11.23	5,754	49	29
4.00	Ganho	20	p12.1	717	5	4
3.00	Ganho	20	p12.1	5,391	31	15
3.00	Ganho	20	p13	13,602	130	75
12.00	Ganho	20	q11.21	1,384	33	14

	LOH	20	q11.21	8,004	115	63
3.00	Ganho	20	q12	24,494	285	165
3.00	Ganho	21	p11.2	38,449	304	147
3.00	Ganho	22	q11.1	6,112	113	60
	LOH	22	q11.1	35,159	549	337
4.00	Ganho	X	p22.33	68,448	419	305
3.00	Ganho	X	q13.1	2,785	43	27
4.00	Ganho	X	q13.1	83,782	559	339

Tabela 14 anexo – Caso 28

Número de cópias	Tipo	Cromossomo	Citobanda de início	Tamanho(kbp)	Quantidade de Genes	OMIM® Quantidade de Genes
3.00	Ganho	1	p32.1	117,926	982	626
2.67	Ganho	1	p36.33	58,321	828	471
4.50	Ganho	1	q25.2	67,058	487	310
6.00	Ganho	1	q44	975	3	2
3.00	Ganho	1	q44	2,958	68	8
2.33	Ganho	2	p12	74,302	397	207
2.33	Ganho	2	p16.1	23,074	163	101
2.67	Ganho	2	p21	11,515	47	29
2.33	Ganho	2	p23.1	15,310	92	53
2.67	Ganho	2	p25.3	31,993	202	125
2.33	Ganho	2	q34	3,041	10	9
2.67	Ganho	3	p26.3	166,340	1,051	621
3.67	Ganho	3	q26.1	31,437	228	140
15.00	Ganho	4	p16.3	1,341	28	17
9.33	Ganho	4	p16.3	435	10	8
3.67	Ganho	4	p16.3	1,720	23	13
4.33	Ganho	5	p15.33	46,363	187	101
3.00	Ganho	6	p25.3	42,550	575	382
2.33	Ganho	7	p11.2	40,172	224	122
4.00	Ganho	7	p14.3	6,279	35	17
5.33	Ganho	7	q21.3	3,642	106	64
3.33	Ganho	7	q22.1	17,360	99	56
2.33	Ganho	7	q31.31	4,266	15	11
3.33	Ganho	7	q31.32	34,708	311	165
2.33	Ganho	8	p23.3	117,502	626	368
3.67	Ganho	8	q23.3	28,616	212	114
2.33	Ganho	9	q21.11	70,070	677	381
2.67	Ganho	10	p15.3	94,390	563	307
2.33	Ganho	10	q23.33	33,821	310	191
3.00	Ganho	10	q26.2	2,446	7	4

3.33	Ganho	11	p15.5	57,830	595	325
4.33	Ganho	11	q12.1	1,792	36	14
3.00	Ganho	11	q12.1	3,307	109	73
2.33	Ganho	11	q13.4	59,783	446	263
3.33	Ganho	12	p13.33	48,954	396	263
4.33	Ganho	12	q13.12	6,720	179	121
3.67	Ganho	12	q13.2	2,305	96	67
4.33	Ganho	12	q14.1	6,906	25	15
6.00	Ganho	12	q14.3	9,667	54	38
2.67	Ganho	12	q21.1	59,030	437	261
2.33	Ganho	13	q13.3	3,084	17	8
2.33	Ganho	13	q21.31	50,893	181	98
2.67	Ganho	14	q11.2	20,078	211	134
2.67	Ganho	14	q21.2	61,909	565	301
2.33	Ganho	17	p13.3	79,862	1,351	822
3.00	Ganho	18	p11.32	2,255	12	8
3.67	Ganho	18	p11.32	50,878	230	129
3.50	Ganho	18	q21.2	24,280	101	61
3.00	Ganho	19	p13.3	19,220	486	288
2.33	Ganho	19	q11	12,886	222	124
2.33	Ganho	19	q13.2	17,242	716	365
3.67	Ganho	20	p12.1	741	5	4
2.67	Ganho	20	p12.1	11,895	85	48
3.00	Ganho	20	p13	13,583	130	75
10.00	Ganho	20	q11.21	905	27	13
2.67	Ganho	20	q12	24,461	285	165
3.00	Ganho	21	p11.2	38,449	304	147
2.33	Ganho	22	q11.1	5,045	85	43
2.67	Ganho	22	q11.21	1,059	29	18
2.67	Ganho	X	p22.33	68,093	417	304
3.00	Ganho	X	q13.1	83,787	559	339
1.67	Perda	4	q13.1	43,827	238	170
1.67	Perda	4	q26	26,940	82	49
1.67	Perda	4	q35.1	4,008	15	8
1.67	Perda	5	q22.3	8,933	33	18
1.67	Perda	5	q31.1	1,972	25	17

1.33	Perda	7	q36.3	1,333	8	3
1.67	Perda	9	p24.3	31,578	122	83
1.67	Perda	10	q26.3	4,622	41	19
1.67	Perda	13	q14.2	3,218	39	20
1.67	Perda	15	q11.1	69,207	731	361
1.67	Perda	15	q26.1	9,884	50	20
1.67	Perda	16	p13.3	89,895	945	561
1.67	Perda	19	p13.3	5,066	173	124
1.67	Perda	22	q11.21	29,027	437	278
	LOH	1	p32.1	968	5	2
	LOH	3	p21.31	2,946	90	64
	LOH	4	q13.1	43,873	238	170
	LOH	4	q24	85,121	327	192
	LOH	5	q11.1	131,256	848	538
	LOH	6	p21.1	128,819	654	407
	LOH	7	p22.3	54,820	343	201
	LOH	11	p11.2	4,982	51	28
	LOH	13	q11	96,018	460	240
	LOH	14	q21.1	6,977	19	12
	LOH	15	q11.2	79,645	807	406
	LOH	16	p13.3	90,074	955	567
	LOH	17	p13.3	79,862	1,351	822
	LOH	19	p13.3	5,050	173	124
	LOH	19	q12	30,322	973	512
	LOH	20	q11.21	7,307	115	63
	LOH	22	q11.1	35,159	549	337
	LOH	X	p11.22	4,253	44	33
	LOH	X	p22.13	3,205	18	11
	LOH	X	q11.1	5,691	18	12
	LOH	X	q13.1	2,988	46	30
	LOH	X	q13.2	4,874	25	19
	LOH	X	q26.2	2,721	28	15

Tabela 15 anexo – Caso 29

Número de cópias	Tipo	Cromossomo	Citobanda de início	Tamanho(kbp)	Quantidade de Genes	OMIM® Quantidade de Genes
2.50	Ganho	1	p36.33	46,048	722	416
3.00	Ganho	1	q41	25,384	229	97
3.00	Ganho	2	q14.2	96,696	470	293
2.50	Ganho	4	p16.3	1,880	37	21
3.00	Ganho	7	q22.1	58,704	454	248
2.50	Ganho	8	q24.3	2,908	102	56
3.00	Ganho	9	q34.11	10,443	250	149
3.00	Ganho	12	p11.22	3,934	21	6
2.50	Ganho	12	q13.13	4,873	167	109
2.50	Ganho	16	p11.2	3,750	122	63
3.00	Ganho	17	q21.33	2,628	25	17
4.00	Ganho	19	p13.11	3,096	72	45
3.00	Ganho	19	p13.2	8,053	247	150
3.00	Ganho	19	q11	5,753	35	17
1.00	Perda	2	p15	2,077	13	10
1.50	Perda	4	q28.1	1,441	8	5
1.00	Perda	7	p22.3	4,370	42	26
1.00	Perda	8	q21.13	44,474	197	119
1.00	Perda	8	q24.21	6,344	25	14
1.00	Perda	10	q23.31	45,800	403	244
1.00	Perda	11	p15.5	134,746	1,464	873
1.00	Perda	12	p13.31	21,398	229	158
1.00	Perda	14	q11.2	87,063	778	437
1.00	Perda	15	q22.31	2,623	41	23
1.00	Perda	17	p13.3	43,366	844	502
1.00	Perda	17	q25.1	7,033	170	101
1.00	Perda	19	p13.3	8,904	277	194
1.00	Perda	19	q13.11	24,957	939	496
1.00	Perda	21	q22.3	2,840	64	31
1.00	Perda	22	q11.1	35,159	549	337
	LOH	2	p16.1	3,344	26	17

	LOH	2	q35	25,760	262	163
	LOH	3	p12.3	8,940	11	6
	LOH	3	p21.31	3,088	84	54
	LOH	3	q12.1	1,436	14	7
	LOH	4	q28.1	1,458	8	5
	LOH	7	p22.3	4,438	42	26
	LOH	7	q11.1	3,021	14	0
	LOH	8	q21.13	53,020	233	135
	LOH	10	q22.1	3,367	47	30
	LOH	10	q23.2	46,809	422	252
	LOH	11	p15.5	134,746	1,464	873
	LOH	12	p13.31	20,539	200	136
	LOH	14	q11.2	87,063	778	437
	LOH	16	p11.2	2,743	13	0
	LOH	17	p13.3	79,862	1,351	822
	LOH	19	p13.3	8,819	277	194
	LOH	19	q13.11	24,957	939	496
	LOH	21	q22.3	2,870	65	31
	LOH	22	q11.1	35,159	549	337
	LOH	X	q11.1	6,260	20	13
	LOH	X	q21.1	2,957	4	4
	LOH	X	q22.3	3,159	20	12
	LOH	X	q23	2,595	16	7