

**CARACTERIZAÇÃO DE ALTERAÇÕES GENÔMICAS
EM PACIENTES PORTADORES DE MÚLTIPLOS
TUMORES PRIMÁRIOS**

TATIANE RAMOS BASSO

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

Área de concentração: Oncologia

Orientadora: Profa. Dra. Silvia Regina Rogatto

Co-Orientadora: Dra. Maria Isabel Achatz

São Paulo

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Basso, Tatiane Ramos

Caracterização de alterações genômicas em pacientes portadores de múltiplos tumores primários / Tatiane Ramos Basso – São Paulo, 2019.

87p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientadora: Silvia Regina Rogatto

Descritores: 1. Neoplasias da Mama/Breast Neoplasms. 2. Neoplasias Colorretais/Colorectal Neoplasms. 3. Neoplasias/Neoplasms. 4. Sequenciamento Completo do Exoma/Whole Exome Sequencing

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

Marcos 8:36

DEDICATÓRIA

Eu dedico ao meu **Deus**, com a permissão dele hoje eu posso concluir mais esse degrau na minha vida. Por sempre me dar sabedoria, força, coragem e muita fé para seguir em frente e conquistar todos os meus sonhos e vencer todos os desafios mesmo quando tudo e todos dizem que não. Tudo na minha vida é com a graça de Deus.

E dedico a toda minha família, eles são meus melhores amigos e tudo o que eu tenho nessa vida. Eles fazem da minha vida uma festa constante independente de qualquer situação, eles são essência nesse mundo frio. Minha gratidão pela vida deles será eterna. Sou abençoada demais.

AGRADECIMENTOS

Eu agradeço a minha Orientadora Professora Dra. **Silvia Regina Rogatto**, por sua dedicação e paciência em todos os momentos, por todas as oportunidades que nos proporciona sempre pensando no crescimento de todo o grupo. Por ser esse exemplo de pessoa e profissional mantendo sua humildade acima de tudo. Sem ela isso não estaria acontecendo, todo mérito desse trabalho e de todos que participei durante esses oito anos é dela. Muito obrigada.

Agradeço a todos colegas do **A.C.Camargo Cancer Center**, por tornarem esse Centro de atendimento e pesquisa em câncer, uma referência Nacional e Internacional. Sinto muito orgulho em ter feito parte dessa equipe onde se encontram ou passaram alguns dos melhores pesquisadores do Brasil. Obrigada por tudo!

Agradeço ao *Department of Clinical Genetics, University Hospital of Southern Denmark. Institute of Regional Health Research, University of Southern Denmark, Vejle, DK*, pelo período que pude passar na Dinamarca, foram inúmeros desafios e aprendizados como profissional e ser humano. Thank you.

Agradeço a todos que participaram diretamente ou indiretamente desse trabalho, ninguém chega a lugar algum sozinho e eu sou muito grata por tudo.

RESUMO

Basso TR. **Caracterização de alterações genômicas em pacientes portadores de múltiplos tumores primários**. São Paulo; 2019. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Os indivíduos com múltiplos tumores primários e ou com membros da família acometidos por câncer são sugestivos de pertencerem a alguma síndrome de predisposição hereditária ao câncer (SPHC). No entanto, muitos pacientes não se enquadram nos critérios clínicos clássicos das SPHC ou preenchem critérios clínicos, mas não apresentam variantes nos principais genes já descritos como associados a estas síndromes. Foi utilizada a técnica de sequenciamento do exoma (NextSeq 500, Illumina) em amostras de sangue periférico de 20 pacientes portadores de, no mínimo, dois tumores primários comuns na população humana, o câncer de mama (CM) e colorretal (CRC). Estes pacientes também tinham história positiva destes ou outros tumores em familiares (exceto um caso que não tinha história familiar de câncer). O objetivo principal foi identificar alterações germinativas associadas com o risco de desenvolvimento destes tumores. O CM foi o primeiro tumor diagnosticado em 12 pacientes, o CCR em seis casos, um caso teve tumor renal como primário e um caso tumor de ovário. Onze pacientes tiveram dois tumores primários, sete pacientes tiveram três tumores primários, um paciente teve quatro tumores primários e um paciente teve cinco tumores primários. Todos os casos-índice eram negativos para variantes patogênicas no gene *TP53*. Foram identificadas 4869 variantes, sendo 39 classificadas como patogênicas (P) ou *provavelmente patogênicas* (LP) e 4830 como variantes de significado incerto (VUS). Quatro casos-índice (1, 12, 14 e 25) não apresentaram variantes P ou LP e todos os casos apresentaram VUS. O caso 4, apresentou uma variante patogênica no gene *APC* (c.465delA; p.Asp156Thrfs*14) e uma LP no gene *MUTYH* (c.1187G>A; p.Gly396Asp), ambas em heterozigose. A variante no gene *MUTYH* foi confirmada como positiva por sequenciamento de Sanger enquanto a variante no gene *APC* era falsa positiva. Vários casos apresentaram VUS em genes de reparo a erros de pareamento, incluindo dois

probandos no gene *MSH6* (casos 20 e 26), dois casos no *MLH1* (casos 17 e 22) e um caso no gene *POLE* (caso 16). O caso 22 apresentou três variantes no gene *MLH1*, sendo uma LP (c.1852_1853insTTCT; p.Lys618Ilefs*4). Dois probandos (casos 12 e 24) apresentaram VUS no gene *BRCA1* e o caso 16 no gene *ATM*. A presença de variantes em genes de reparo a erros de pareamento poderia explicar a presença destes tumores em uma parcela dos pacientes. Entretanto, estudos funcionais e de segregação são essenciais para confirmar os achados. É possível também que alterações em múltiplos genes ou outros eventos, como alterações no número de cópias ou rearranjos genômicos, estejam envolvidos no risco de desenvolvimento de múltiplos tumores primários descritos neste estudo.

Descritores: Neoplasias da Mama. Neoplasias Colorretais. Neoplasias/Neoplasms. Sequenciamento Completo do Exoma

SUMMARY

Basso TR. [Characterization of genomic alterations in patients with multiple primary tumors]. São Paulo; 2019. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente]

Individuals with multiple primary tumors and/ or family members with cancer may carry a hereditary cancer predisposition syndrome (SPHC). However, some patients did not meet the clinical criteria of SPHC or meet these criteria but not harbored known pathogenic variants in cancer predisposition genes already described in these syndromes. In this study, we have investigated by exome sequencing (NextSeq 500, Illumina) 20 patients with at least two primary cancers that are frequent in the general population, including breast (BC) and colorectal (CCR) cancer. These patients also have a positive history of these or other tumors in relatives (except for one case that had no history of cancer). The main objective was to identify germline pathogenic variants in cancer predisposing genes that might be associated with a higher risk of developing these tumors. The BC was the first tumor diagnosed in 12 patients, CCR in six cases; one case had a primary kidney tumor and one case an ovarian cancer. Eleven patients had two primary tumors, seven had three primary tumors, one had four primary tumors, and one patient had five primary tumors. All index cases were negative for pathogenic variants in the *TP53* gene. We have identified 4869 variants, 39 were classified as pathogenic (P) or likely pathogenic (LP), and 4830 as variants of uncertain significance (VUS). Four index cases (1, 12, 14 and 25) did not present P or LP variants. All patients included in this study presented at least one VUS. Case 4 presented a pathogenic variant in *APC* (c.465delA; p.Asp156Thrfs * 14) and an LP in the *MUTYH* gene (c.1187G> A; p.Gly396Asp), both in heterozygous. In this case, the *MUTYH* gene pathogenic variant was confirmed by Sanger sequencing while the *APC* variant was a false positive. Several cases presented VUS in the mismatch repair genes, including two probands (cases 20 and 26) in the *MSH6* gene (VUS), two cases in *MLH1* (cases 17 and 22), and one case in the *POLE* gene (case 16). Case 22 presented three variants

in the *MLH1* gene, one LP (c.1852_1853insTTCT; p.Lys618Ilefs * 4). VUS were detected in the *BRCA1* gene in two probands (cases 12 and 24) and in the *ATM* gene in another (case 16). Overall, the presence of mismatch repair gene variants has the potential to explain the presence of these multiple tumors in a set of patients. However, functional and segregation studies are essential to confirm the findings. It is also possible that alterations in several genes or other events such as copy number alterations or genomic rearrangements, or others not yet well established, be related to the risk of these multiple primary tumors.

Key-words: Breast Neoplasms. Colorectal Neoplasms. Neoplasms. Whole Exome Sequencing

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-----------------|---|----|
| Figura 1 | Esquema representativo das principais etapas do processo de preparo das bibliotecas e sequenciamento..... | 32 |
| Figura 2 | Resumo do <i>pipeline</i> utilizado para análise do sequenciamento do exoma..... | 36 |
| Figura 3 | Eletroferogramas representativos das variantes patogênica e <i>possivelmente patogênica</i> detectadas no caso 4 por sequenciamento do exoma (SET)..... | 43 |
| Figura 4 | Heredogramas representativos dos casos 4 e 22..... | 43 |
| Figura 5 | Heredograma da paciente 26 a qual apresentou três tumores primários e inúmeros casos de câncer na família, incluindo mama e colorretal. | 52 |

LISTA DE TABELA E QUADROS

| | | |
|-----------------|---|----|
| Tabela 1 | Resumo dos resultados da cobertura média após o sequenciamento do exoma e número de variantes obtidas em 20 pacientes deste estudo .. | 40 |
| Quadro 1 | Caracterização dos 20 pacientes incluídos no estudo e analisados por sequenciamento total de exoma..... | 17 |
| Quadro 2 | Variantes patogênicas (P) e provavelmente patogênicas (LP) detectadas entre os 20 pacientes incluídos no estudo..... | 44 |
| Quadro 3 | Variantes identificadas (patogênicas, provavelmente patogênicas e de significado incerto) em genes associados a síndromes associadas ao câncer de mama hereditário..... | 48 |
| Quadro 4 | Variantes (P, LP e VUS) identificadas em genes associados a síndromes de câncer colorretal hereditário bem estabelecidas em literatura | 50 |
| Quadro 5 | Alterações germinativas descritas em pacientes com câncer segundo o banco de dados COSMIC | 54 |
| Quadro 6 | Genes que apresentaram variantes de significado incerto (VUS) detectadas em mais de um caso entre os 20 pacientes e que foram comparadas com o banco de dados <i>Cancer Gene Census</i> | 56 |
| Quadro 7 | Genes alterados em mais de um caso considerando as variantes P/LP (patogênicas e provavelmente patogênicas) e VUS (variantes de significado incerto)..... | 60 |

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

| | |
|-----------------|---|
| a | Anos de idade |
| ACMG* | American College of Medical Genetics and Genomics |
| AG | Aconselhamento genético |
| AMP* | Association for Molecular Pathology |
| B | Benignas |
| CA | Câncer |
| CCR | Câncer Colorretal |
| CEC | Carcinoma espinocelular |
| CEP | Comitê de Ética em Pesquisa |
| ClinVar* | Clinical Genome Resource (ClinVar aggregates information about genomic variation and its relationship to human health) (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/). |
| CM | Câncer de mama |
| cnLOH* | Copy loss of heterozygosity |
| CNVs | Variações do número de cópias |
| CONEP | Comissão Nacional de Ética em Pesquisa |
| COSMIC* | Catalogue of Somatic Mutations in Cancer |
| DK* | Denmark |
| DNA* | Deoxyribonucleic Acid |
| E | Esquerda |
| EAM* | Enrichment Amplification Mix |
| EHB1* | Enrichment Hybridization Buffer 1 |
| EHB2* | Enrichment Hybridization Buffer 2 |
| ET2* | Elute Target Buffer 2 |
| EWS* | Enrichment Wash Solution |
| FS* | Strand Bias-Fisher |
| gDNA | DNA genômico |
| h | hora |
| HBOC* | Hereditary Breast and Ovarian Cancer Syndrome |
| IARC* | International Agency for Research on Cancer |

| | |
|----------------|--|
| ID | Identificação |
| INCA | Instituto Nacional do Câncer |
| Kb* | Kilo base |
| LAM* | Library Amplification Mix |
| LB | Provavelmente benignas |
| LFS | Síndrome de Li-Fraumeni |
| LP | Provavelmente patogênicas |
| M | Concentração Molar |
| MAP | Polipose associada ao <i>MUTYH</i> |
| Mb* | Mega base |
| min | minuto |
| mL | Mililitro |
| MT | Múltiplos Tumores |
| ND | NanoDrop |
| ng | nanograma |
| NGS* | Next Generation Sequencing (em português, sequenciamento de alto desempenho) |
| °C | Grau Celsius |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| P | Patogênica |
| PCR* | Polymerase Chain Reaction |
| pH | Potencial Hidrogeniônico |
| PPC* | PCR Primer Cocktail Mix |
| QT | Quimioterapia |
| RefSeq* | Reference Sequence |
| RNA* | Ribonucleic Acid |
| rpm | rotação por minuto |
| RSB* | Resuspension Buffer |
| RT | Radioterapia |
| SAV* | Software Analysis Viewer |
| seg | segundos |
| SET | Sequenciamento total do exoma |
| SIR* | Standardized Incidence Rate |

| | |
|-------------|--|
| SL | Síndrome de Lynch |
| SMB* | Streptavidin Magnetic Beads |
| SNC | Sistema Nervoso Central |
| SO | Sarcoma Ósseo |
| SPB* | Sample Purification Beads |
| SPHC | Síndromes de predisposição hereditária ao câncer |
| SPM | Sarcoma de Partes Moles |
| STP | Segundo tumor primário |
| tSET | SET de genes alvos |
| uL | Microlitros |
| VCF* | Variant call format |
| VUS | Variante de significado incerto |

*siglas ou abreviaturas derivadas do inglês;

ÍNDICE

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 1.1 | Testes Genéticos para a Identificação de Variantes Associadas ao Câncer.... | 10 |
| 1.2 | Sequenciamento total do exoma (SET)..... | 11 |
| 2 | JUSTIFICATIVA..... | 14 |
| 3 | OBJETIVOS..... | 15 |
| 4 | PACIENTES E MÉTODOS..... | 16 |
| 4.1 | Casuística | 16 |
| 4.2 | Extração de DNA | 23 |
| 4.3 | Sequenciamento do Exoma Total (SET)..... | 23 |
| 4.3.1 | Construção das Bibliotecas do Exoma..... | 23 |
| 4.3.2 | Pré-Sequenciamento e Sequenciamento do Exoma | 30 |
| 5 | RESULTADOS..... | 39 |
| 6 | DISCUSSÃO..... | 62 |
| 7 | CONCLUSÕES | 75 |
| 8 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS..... | 78 |

ANEXO

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

APÊNDICE

Apêndice 1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido-TCLE

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo. Segundo o *World Cancer Report 2014* (*International Agency for Research on Cancer-IARC*, Organização Mundial da Saúde-OMS), o câncer é um problema de saúde pública. Estimativas apontam que nas próximas décadas o impacto do câncer na população corresponda a 80% dos mais de 20 milhões de casos novos estimados para 2025. Estima-se, para o Brasil, biênio 2018-2019, a ocorrência de 600 mil casos novos de câncer, para cada ano. Em nosso país, os cânceres de próstata, pulmão, mama feminina e cólon e reto estão entre os mais incidentes sendo também observadas altas taxas para os cânceres do colo do útero, estômago e esôfago (Ministério da Saúde 2019; OMS 2019). MILLER et al. (2016) relataram mais de 15,5 milhões de americanos com histórico de câncer que estavam vivos em 1 de janeiro de 2016. Segundo os autores, este número deverá atingir mais de 20 milhões até 1 de janeiro de 2026. Os três cânceres mais prevalentes descritos foram próstata (3.306.760), cólon e reto (724.690) e melanoma (614.460) entre homens e mama (3.560.570), útero (757.190), cólon e reto (727.350) entre mulheres. Mais da metade (56%) dos sobreviventes foram diagnosticados nos últimos 10 anos e quase metade (47%) tem 70 anos ou mais velhos (MILLER et al. 2016).

Estima-se que 5 a 10% de todos os tumores malignos detectados sejam hereditários e que 20 a 30% correspondam a agrupamentos familiares de câncer (LINDOR et al. 2008). Em uma análise de pacientes portadores de múltiplos tumores e familiares afetados pelos mesmos cânceres GOLDGAR et al. (1994), já relatava

uma associação com fatores genéticos nessas famílias. Atualmente, é reconhecido que indivíduos jovens com câncer que apresentam múltiplas neoplasias e/ou pacientes com vários familiares acometidos por tumores podem ser portadores de síndromes de predisposição hereditária ao câncer (SPHC) (TUCKER e FRIDMAN 2002; MONSALVE et al. 2011). Neste caso, uma parcela significativa destes pacientes apresenta variantes germinativas em genes (principalmente supressores de tumor) de alta penetrância e um elevado risco de desenvolver múltiplos tumores ao longo da vida. Os múltiplos tumores primários afetam uma proporção substancial de pacientes que sobrevivem ao câncer. Atualmente, são realizados testes genéticos para identificar alterações germinativas em genes de predisposição ao câncer nesses indivíduos (TUCKER e FRIDMAN 2002; ALMEIDA e STRATAKIS 2010; WHITWORTH et al. 2018).

Outros fatores podem estar envolvidos no desenvolvimento de múltiplos tumores, como o tratamento (radioterapia e quimioterapia) de um primeiro tumor, fatores ambientais e de estilo de vida (por exemplo, consumo de tabaco e álcool e exposição à radiação solar) (CYBULSKI et al. 2014; UTADA et al. 2014).

WEIR et al. (2016) descreveram um aumento no número de pacientes diagnosticados com múltiplos tumores primários (MTP), passando de 7,8% em 1975 para 19,7% em 2011. Os autores sugerem que aumento foi relacionado ao aumento das taxas de sobrevivência por câncer como resultado do diagnóstico precoce e melhorias nas escolhas de tratamento. Um estudo semelhante feito no Canadá no período de 1992 a 2012 e utilizando o *Canadian Cancer Register (CCR)* e dados do IARC demonstraram que o risco para o desenvolvimento de câncer subsequente a um

primário continua a aumentar assim como a idade das pessoas que sobrevivem ao primeiro tumor (ZAKARIA 2018).

As principais SPHC e os genes preferencialmente mutados associadas a elas são: Síndrome de Li-Fraumeni, envolvendo variantes em *TP53*; Síndrome do Câncer de Mama e Ovário Hereditários, associada principalmente a variantes em *BRCA1* e *BRCA2*; Síndrome de Lynch, relacionada a variantes em genes de reparo a erros de pareamento (incluindo *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* e *PMS2*) e Polipose Adenomatosa Familiar, envolvendo variantes no gene *APC* (LINDOR et al. 2008; CYBULSKI et al. 2011; BUERKI et al. 2012). Pacientes com câncer de mama e colorretal foram categorizados pelos critérios de MEIJERS-HEIJBOER et al. (2003) e NASEEM et al. (2006). O critério de MEIJERS-HEIJBOER et al. (2003) recomenda que pelo menos dois parentes de primeiro ou segundo grau da paciente tenham sido diagnosticados com câncer de mama antes dos 60 anos de idade. Além disso, os pacientes devem preencher um dos critérios: 1) Pelo menos um indivíduo diagnosticado com câncer de mama (CM) ou de cólon (CCR) em qualquer idade; 2) Pelo menos um indivíduo com CCR diagnosticado antes dos 50 anos de idade e um parente de primeiro ou segundo grau do paciente com câncer de mama; 3) Pelo menos dois indivíduos diagnosticados com CCR em qualquer idade e um parente de primeiro ou segundo grau do paciente com câncer de mama. Os critérios definidos por NASEEM et al. (2006) são: (1) indivíduo diagnosticado com câncer de mama e cólon em qualquer idade além de um caso adicional desses tumores em familiares de primeiro ou segundo grau; 2) presença de um indivíduo diagnosticado com CCR antes dos 50 anos de idade e um membro da família diagnosticado com câncer de mama antes dos 50 anos de idade ou dois parentes com câncer de mama

diagnosticado em qualquer idade; 3) história de dois indivíduos diagnosticados com CRC em qualquer idade e pelo menos um membro da família diagnosticado com câncer de mama antes dos 50 anos de idade ou dois casos de câncer de mama diagnosticados em qualquer idade.

Embora um número considerável de pacientes clinicamente diagnosticados com SPHC tenham variantes em genes frequentemente descritos como associados a estas síndromes, uma alta proporção deles que atendem aos critérios diagnósticos clínicos não tem variantes patogênicas nos principais genes relacionados a estas síndromes. Por exemplo, 30% dos pacientes com Síndrome de Li-Fraumeni (LFS) não têm variantes em *TP53*; 60% dos casos que preenchem os critérios clínicos para a Síndrome de Lynch (SL) não apresentam variantes nos genes de reparo a erros de pareamento (*MMR: MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2*); e 76% dos pacientes com síndrome do câncer de mama e ovário hereditários (HBOC) não possuem variantes em *BRCA1* ou *BRCA2* (MCBRIDE et al. 2014; CARNEIRO DA SILVA et al. 2015; KAST et al. 2016). Esses achados apontam a necessidade de mais estudos para desvendar os mecanismos que contribuem para o desenvolvimento destes tumores e identificar novos genes de predisposição ao câncer.

O desenvolvimento de tumores primários subsequente ao tratamento de pacientes submetidos à radioterapia já foi previamente relatado e é mais prevalente em crianças e adultos jovens (NEGLIA et al. 2006a; KLEINERMAN 2009; MEADOWS et al. 2009; HARBRON et al. 2013; ALKNER et al. 2015). HARBRON et al. (2013) relataram que pacientes com câncer (idade entre 0 e 29 anos) tratados com radioterapia apresentaram um risco quase cinco vezes maior de desenvolver outra neoplasia quando comparados à população em geral na mesma faixa etária. Os

cânceres radio-induzidos mais comuns foram os de sistema nervoso central (28%), sarcomas (25%) e leucemias (19%).

As causas e mecanismos associados ao aparecimento de um segundo tumor primário após o diagnóstico do câncer de mama são pouco relatados em literatura. ZHENG et al. (2018) obtiveram os dados do seguimento clínico de 87.752 pacientes do sexo feminino portadoras de tumores de mama e o desenvolvimento de segundo tumores primários (STP). Os autores avaliaram os riscos de óbito e compararam pacientes com e sem história familiar de câncer em relação aos riscos relativos para STP. Após um seguimento de cinco anos, 14.952 pacientes desenvolveram um segundo tumor, entre elas 10.280 (68,8%) apresentaram história familiar de cânceres em parentes de primeiro grau, sendo relatado que a principal causa de óbito era a presença de um segundo tumor primário (ZHENG et al. 2018).

Em um estudo recente, BROMAN et al. (2019) obtiveram os dados de seguimento clínico de 281.413 pacientes diagnosticados com câncer colorretal (CCR) em um período de cinco anos. O objetivo principal deste estudo foi identificar o risco de desenvolvimento de STP quando comparado com a localização do primeiro tumor (cólon direito, cólon esquerdo ou reto). Resumidamente, a presença do STP foi observada em 12.064 (4,3%) pacientes, entre eles 64% dos pacientes tinham CCR como tumor primário. Segundo os autores, a localização dos cânceres colorretais não afetava apenas o tipo e a resposta ao tratamento da doença, mas também a localização do possível segundo tumor primário. Os dados crescentes em literatura de pacientes com CCR em idade precoce e os riscos de desenvolvimento do segundo tumor primário ressaltam a necessidade de estratégias de rastreamento, aconselhamento genético e outras medidas cabíveis (XING et al. 2018).

MORTON et al. (2017) selecionaram pacientes diagnosticados com os tipos mais comuns de cânceres antes dos 21 anos de idade em um dos 26 centros participantes dos Estados Unidos e Canadá. Esse estudo demonstrou que os sobreviventes tratados com radioterapia dirigida ao tórax têm risco substancialmente elevado de desenvolvimento de câncer de mama. Os autores realizaram a genotipagem nos grupos de interesse (207 sobreviventes que desenvolveram câncer de mama após o primeiro tumor, 2774 que não desenvolveram qualquer tumor subsequente a partir do último acompanhamento e grupos controle). Entre os sobreviventes que receberam 10 ou mais exposições à radiação mamária, o *locus* em 1q41 foi associado ao risco subsequente de câncer de mama (rs4342822, gene mais próximo *PROXI*, alelo de risco nos grupos controle). Estes dados revelaram que alguns alelos de risco podem contribuir para o desenvolvimento de tumores em períodos tardios (MORTON et al. 2017).

O tumor de próstata tem um componente hereditário significativo, o qual inclui história familiar de câncer de mama. A presença de variantes deletérias raras na linhagem germinativa nestes pacientes pode aumentar o risco da doença nas famílias. PILIÉ et al. (2017) sequenciaram um painel de 160 genes envolvidos em 102 pacientes portadores de cânceres de próstata com história de no mínimo um outro tumor primário. Esta análise revelou a presença de aproximadamente 3500 variantes, nove variantes deletérias em seis genes incluindo *BRCA2*, *ATM*, *MLH1* e *BRCA1* (os quais resultaram em proteína truncada). No total, 11 dos 102 pacientes (10,8%) apresentaram variantes patogênicas em genes de predisposição hereditária ao câncer. Estes dados mostraram que pacientes que desenvolvem tumores não

característicos de síndromes hereditárias podem apresentar variantes patogênicas em genes associados a estas síndromes.

O registro nacional de câncer de Israel (do inglês, *Israel National Cancer Register*) inclui dados de 40.090 mulheres com câncer de mama invasivo registradas no período de 1996 a 2006, sendo significativos aqueles de pacientes que apresentaram um segundo tumor primário. SILVERMAN et al. (2016) utilizaram esse banco de dados e calcularam o risco de um segundo câncer primário e as razões de incidência padrão (SIR – do inglês, *standardized incidence rate*) baseado nos dados de risco de câncer idade-específica da população de Israel. Os autores também estratificaram o período (1992 a 1996, 1997 a 2001, 2002 a 2006) e idade ao diagnóstico (< 50 e \geq 50 anos). A probabilidade de um segundo tumor foi de 3,6% em 5 anos; 8,2% em 10 anos e 13,9% em 15 anos. O SIR para qualquer tipo de segundo tumor primário excluindo o câncer de mama foi de 1,26 (95% CI, 1.23 a 1.30). Foram descritos riscos significativamente aumentados para o câncer colorretal, uterino, pulmão, ovário e tireoide em todos os períodos. Mulheres mais jovens apresentaram riscos maiores do que aquelas com idade superior a 50 anos (SIR: 1,77; 95% CI: 1,63 a 1,91] e SIR:1,20; 95% CI; 1,15 a 1,24, respectivamente. Em concordância com outros estudos, os autores relataram que o aparecimento do segundo tumor primário pode estar relacionado com o tratamento radioterápico, hormonal ou a predisposição hereditária (SILVERMAN et al. 2016).

Em um estudo prévio do nosso grupo VILLACIS et al. (2017a) foram investigados dois pacientes que se enquadravam nos critérios clínicos das síndromes hereditárias ao câncer, mas não apresentam variantes nos genes relacionados (*BRCA1*, *BRCA2* e *TP53*). Entre os múltiplos tumores primários destas pacientes,

havia a presença de cânceres de mama triplo negativos. Foi detectada uma alteração germinativa no cromossomo 7q, envolvendo mais de 40Mb em ambas as pacientes: uma com perda em mosaico (80% das células) e a outra com cnLOH (do inglês, *copy number loss of heterozygosity*) secundária à duplicação de alelos maternos. Foram testados pela mesma metodologia cinco parentes desses pacientes e os mesmos não tinham alterações em 7q. Os dois casos índice compartilharam 330 genes em comum mapeados em 7q22.1-q34, incluindo vários supressores tumorais anteriormente relacionados ao risco de câncer de mama, os quais podem explicar a presença da doença (VILLACIS et al. 2017a).

Num estudo subsequente de VILLACIS et al. (2017b), nosso grupo revisou 267 pacientes característicos das síndromes de predisposição hereditária ao câncer que foram submetidos ao aconselhamento genético e selecionou 22 pacientes com MTP para serem investigados para alterações genômicas (*CytoScan HD Array*, *Affymetrix*). Dentre esses pacientes, 20 tinham história familiar positiva de cânceres e 11 preenchiam os critérios fenotípicos para síndrome de predisposição hereditária ao câncer. Testes genéticos para cada um dos genes associado a estas síndromes revelaram resultados negativos para variantes patogênicas. Foram identificadas 17 variações de números de cópias (CNVs) germinativas raras que abrangeram 40 genes em 11 pacientes, incluindo uma deleção *EPCAM/MSH2* em um paciente com síndrome de Lynch. A análise de enriquecimento gênico revelou um número significativo de genes associados à carcinogênese e ou relacionado a funções implicadas com o desenvolvimento do tumor como proliferação e sobrevivência celular. No geral, foram identificados 14 casos com CNVs raras e ou cnLOH que

podem contribuir para o risco de desenvolvimento dos múltiplos tumores (VILLACIS et al. 2017b).

Por um período de 14 anos, FAYAZ et al. (2017) acompanharam indivíduos que desenvolveram câncer de mama como primeiro ou segundo tumor primário. Esse estudo foi desenvolvido em um centro de registros do Kuwait, revelando que entre as pacientes com câncer de mama como tumor primário, o câncer colorretal foi o mais prevalente, representando 23% dos casos (FAYAZ et al. 2017).

Levando em consideração vários estudos que indicaram que os cânceres de cólon e reto diferem em etiologia e histologia, YU et al. (2019) investigaram se as associações de câncer de cólon e reto com qualquer outro câncer eram sítio anatômico-específicas. O estudo foi realizado usando o banco de dados de registros de cânceres familiares Suecos. Os riscos relativos de câncer colorretal e câncer de reto foram maiores quando os familiares foram diagnosticados com câncer de cólon (YU et al. 2019).

A detecção de famílias com indivíduos afetados por câncer, assim como o melhor entendimento das SPHC são imprescindíveis para a adoção de medidas de rastreamento mais efetivas na identificação precoce de tumores nestes pacientes (ACHATZ 2008; LINDOR et al. 2008). Familiares em risco podem ser incluídos em programas de redução de risco ou na identificação precoce do câncer. O aconselhamento genético (AG) destas famílias tem o objetivo de orientar os indivíduos em risco sobre a importância da adoção de medidas de rastreamento e estratégias de redução desse risco (ACHATZ 2008).

1.1 TESTES GENÉTICOS PARA A IDENTIFICAÇÃO DE VARIANTES ASSOCIADAS AO CÂNCER

O uso da metodologia de sequenciamento de alto desempenho (do inglês, *Next Generation Sequencing*, NGS) tem sido ressaltado como de relevância no rastreamento dos indivíduos portadores de tumores sugerindo sua inclusão nas diretrizes clínicas para o manejo desses tumores (SERRATI et al. 2016). Estas estratégias usando análises de exoma total (SET) ou de painéis de genes relacionados a estas síndromes têm sido atualmente muito disseminado. O teste genético tornou-se comum em diversas especialidades de atenção primária à saúde, sendo utilizados como ferramenta para o diagnóstico de síndromes hereditárias, entre outras aplicações (KEATING et al. 2008; SHIELDS et al 2008). A confirmação de síndrome hereditária por meio de testes genéticos contribui para as informações sobre o risco associado ao desenvolvimento de tumores nesses pacientes e em familiares, ajudando na orientação e conduta médica.

As variantes genéticas resultantes do SET podem ser classificadas em patogênicas (P), provavelmente patogênicas (LP), de significado incerto (VUS), provavelmente benignas (LB) e benignas (B) (RICHARDS et al. 2015). As VUS têm um impacto desconhecido na saúde, deixando pacientes e profissionais da saúde incertos sobre sua relevância. Nos painéis contendo pelo menos 25 genes de predisposição ao câncer, ao redor de um terço das variantes são classificadas como incertas (VOS et al. 2008; SOLOMON et al. 2017). Em adição à presença de VUS que dificultam a confirmação diagnóstica, há outros obstáculos quando se utilizam testes genéticos na prática clínica. Embora os pacientes aguardam uma precisão nos

resultados, nem todos os laboratórios classificam variantes de forma idêntica ou similar. Para contornar essas dificuldades, foram estabelecidas diretrizes pelo *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG) (<https://www.acmg.net/ACMG/Medical-Genetics-Practice-Resources/Practice-Guidelines.aspx>) e pela *Association for Molecular Pathology* (AMP) para melhorar a interpretação dos dados em todos os centros. Entretanto, ainda são necessários esforços para uniformizar as análises e suas interpretações (RICHARDS et al 2015).

O aumento dos testes genéticos na prática clínica gerou inúmeros conhecimentos das síndromes hereditárias e também há um aumento substancial nas variantes relatadas como significado incerto (DUZKALE et al. 2013; LADUCA et al. 2014). A reclassificação de variantes genéticas representa um grande desafio na área da saúde (TURNER et al. 2019).

1.2 SEQUENCIAMENTO DE ALTO DESEMPENHO (NGS)

O sequenciamento de alto desempenho é baseado em quatro etapas, sendo elas: preparação de amostras, geração de *clusters*, sequenciamento e análise de dados. A preparação de amostra se resume na quebra do DNA genômico aleatoriamente em pequenos fragmentos para que adaptadores se liguem às sequências de DNA alvos. A geração de *clusters* refere-se ao processo em que cada molde de DNA é amplificado, os moldes fluem por meio de uma lâmina de vidro (*flow cell*). Após esses processos, procede-se ao sequenciamento, a etapa onde serão lidos os fragmentos amplificados do DNA. Nesta etapa também é determinada a cobertura de cada sequenciamento, ou seja, o número médio de *reads* que estão

coabrindo cada base de referência. Os dados alinhados são processados por diferentes *softwares* antes de serem analisados, sendo essa a última etapa do sequenciamento (METZKER 2010; GOODWIN et al. 2016).

O armazenamento dos dados brutos gerados do SET é feito na forma de *reads*, as quais contém as informações sobre um fragmento de DNA e um vetor de probabilidade de erro para cada base (DESVILLECHABROL et al. 2018). O tamanho dos *reads* pode variar de *short-reads* (35 a 700 bases) para milhares de bases (*long-reads*) (METZKER 2010; GOODWIN et al. 2016). As *reads* geradas são alinhadas ao genoma de referência e a cobertura do genoma é definida pelo número de *reads* mapeados em uma posição específica (DESVILLECHABROL et al. 2018).

O número de vezes no qual um determinado nucleotídeo é lido determina a precisão para remontagem das *reads* contíguas e aumenta a força estatística associada à sequência correta (DESVILLECHABROL et al. 2018). A cobertura do sequenciamento permite o entendimento sobre a qualidade do mapeamento e a identificação de alterações com maior segurança (DESVILLECHABROL et al. 2018).

A tecnologia de NGS é aplicada para a identificação de alterações germinativas por meio do sequenciamento de exoma completo (SET or *whole-exome sequencing*) e de genes-alvo (target SET – tSET). Os exons são sequências codificadoras presentes em aproximadamente 2,5% do genoma humano (aproximadamente 30 milhões de pares de bases) e onde ocorrem ao redor de 85% das variantes conhecidas relacionadas às doenças (CHOI et al. 2009, METZKER 2010). O SET gera uma grande quantidade de dados, sendo uma estratégia demorada e de alto custo quando comparada a sequenciamento de genes alvo.

2 JUSTIFICATIVA

O diagnóstico de alterações genômicas em pacientes portadores de múltiplos tumores primários e negativos para genes de predisposição já conhecidos tem importantes implicações clínicas na avaliação de risco de desenvolvimento de outros tumores primários e no aconselhamento genético de familiares. Estudos moleculares em pacientes com múltiplos tumores têm sido relacionados com a Síndrome de Li-Fraumeni (caracterizadas por mutações no gene *TP53*). A investigação molecular nestes pacientes portadores de câncer de mama e colorretal e negativas para variantes no gene *TP53* poderá contribuir para melhorar a nossa compreensão dos mecanismos genéticos envolvidos no risco de desenvolvimento destes tumores. A identificação de novas alterações genômicas poderá explicar o fenótipo, auxiliar na definição de critérios para a aplicação de protocolos de rastreamento e acompanhamento clínico para o paciente afetado e seus familiares.

3 OBJETIVOS

Objetivo Geral

Identificar variantes genéticas germinativas associadas ao risco de desenvolvimento de tumores múltiplos.

Objetivos Específicos

- Identificar variantes germinativas que possam explicar o fenótipo desses pacientes;
- Comparar as variantes detectadas com as previamente descritas como de risco para o desenvolvimento de tumores de mama e colorretal;
- Investigar a função dos genes alterados e seu potencial papel no risco de desenvolvimento dos múltiplos tumores primários e história de câncer na família;
- Comparar os achados com bancos de dados públicos e dados da literatura de forma a contribuir para a identificação de alterações candidatas que possam ser úteis para o aconselhamento genético de pacientes e suas famílias.

4 PACIENTES E MÉTODOS

4.1 CASUÍSTICA

Foram incluídos neste estudo 20 pacientes com câncer de mama e colorretal e história familiar positiva destes tumores (câncer de mama e ou colorretal), exceto dois pacientes que não tinham história destes cânceres na família (casos 4 e 14) e dois outros casos que eram positivos para outros tumores na família (casos 16 e 21). O CM foi o primeiro tumor diagnosticado em 12 pacientes, o CCR em seis casos, um caso teve tumor renal como primário e um caso câncer de ovário. Onze pacientes tiveram dois tumores primários, sete pacientes tiveram três tumores primários, um paciente teve quatro tumores primários e um paciente teve cinco tumores primários. (Quadro 1).

Os dados clínicos foram obtidos por meio de entrevistas com os pacientes e ou familiares com a colaboração do Departamento de Oncogenética do A.C.Camargo Cancer Center, São Paulo, Brasil. Todos os casos-índice eram negativos para variantes patogênicas no gene *TP53*.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do A.C.Camargo Cancer Center e pelo CONEP (Processo 2136/15) (Anexo 1). Todos os pacientes envolvidos no estudo assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido-TCLE (Apêndice 1) autorizando o uso de suas amostras para pesquisa. Este estudo foi realizado em parceria com o *Department of Clinical Genetics, University Hospital, Institute of Regional Health Research, University of Southern Denmark, Vejle, DK*.

Quadro 1 - Caracterização dos 20 pacientes incluídos no estudo e analisadas por sequenciamento total de exoma.

| Amostra | Gênero | 1º Tumor | 2º Tumor | 3º Tumor | 4º Tumor | 5º Tumor | História familiar* | Critério para Síndrome de Predisposição Hereditária ao Câncer |
|---------|--------|---|---|-----------------------------------|---|----------|--|---|
| Caso 1 | F | Ca mama (36a) cirurgia ^a | CCR (47a) cirurgia + RT | - | - | - | Pai (Ca próstata) 60a Meia irmã (parte de pai) (Ca mama 40a) óbito Irmã (SNC) 55a/ óbito | HBOC/ Síndrome de Li-Fraumeni (Chompret) |
| Caso 2 | F | Ca mama (55a) cirurgia+QT+ RT | CCR (70a) cirurgia | Melanoma (55a) cirurgia | - | - | Irmã (Ca laringe 55a) Tia materna (Ca pulmão 58a) Prima materna (Ca mama 48a) | Não preenche critérios |
| Caso 4 | F | CCR (38a) cirurgia ^a | Ca mama (40a) cirurgia + QT+ RT+TMX | CA endométrio (46a) | Shwanoma de pele (antebraço) (53a) cirurgia | - | Tia materna (Ca mama 71a) Tia paterna (Ca mama 80a) óbito Tia paterna (Ca estômago 60a) | HBOC, Li-Fraumeni (Chompret) |
| Caso 5 | F | CCR (73a) cirurgia ^a | Ca mama (esquerda) (75a) QT + RT | Ca endométrio (78a) RT + cirurgia | - | - | Sem história de câncer na família | Síndrome Lynch (Bethesda revisado) |
| Caso 8 | F | Ca mama (esquerda) (57a) cirurgia ^a + QT | CCR (65a) (colon distal) cirurgia + QT | - | - | - | Irmão (Leucemia 10a) óbito Tia materna (CCR e Ca ovário 50a) óbito Tia paterna (Ca útero 58a) óbito Tia paterna (Ca mama 62a) óbito | HBOC (linhagem materna) |
| Caso 12 | F | CCR (52a) cirurgia ^a + QT | Ca mama bilateral (73aE) (77aD) cirurgia + QT | - | - | - | Pai (Ca próstata 70a) Irmão (Ca próstata 60a) Irmã (Ca mama e ovário 60a) Irmã (Ca mama 66a) Filha (Ca mama 54a) óbito Sobrinha (Ca mama 43a) Sobrinho (Ca fígado 17a) Sobrinha (Ca mama 42a) | HBOC |
| Caso 13 | F | Ca mama bilateral sincrônico (55a) cirurgia + QT + RT | CCR (57a) cirurgia + QT | - | - | - | Irmã (Ca mama 40a e CCR 48a) Irmã (Ca tireoide 45a) Tia materna (Ca ósseo 52a) | HBOC |

| | | | | | | | | |
|---------|---|--|-------------------------------------|---|--------------------------------|--------------------------------------|---|-------------------------|
| Caso 14 | F | Ca renal (rim E) (66a) cirurgia | Ca mama E (66a) cirurgia | CCR (67a) cirurgia | - | - | Sem história de câncer na família | Não preenche critérios |
| Caso 15 | F | Ca mama (48a) cirurgia ^a + QT + RT | CCR (56a) cirurgia + QT | - | - | - | Irmã (Ca mama bilateral) Mãe (Ca mama e Ca pâncreas) Primo materno (CCR) 2 Primas paternas (Ca mama) | HBOC |
| Caso 16 | F | Ca ovário (62a) QT | CCR (62a) QT | Ca mama (65a) cirurgia + QT | - | - | Pai (Ca língua 61a) óbito Mãe (Cavidade oral 83a)_óbito Avô materno (Ca pulmão 80a) óbito | HBOC |
| Caso 17 | F | CCR (43a) cirurgia ^a | Ca mama (48,54a) cirurgia + QT + RT | - | - | - | Filha (CCR) Irmã (CCR) Mãe (Ca mama) Tio paterno (CCR) | HBOC/ Síndrome de Lynch |
| Caso 18 | F | Ca mama bilateral (64a) | CCR (71a) | - | - | - | Irmã (Ca mama 68a) | HBOC |
| Caso 19 | F | Ca mama (61a) QT+ RT | CCR (68a) cirurgia + QT | - | - | - | Avó paterna (Ca mama) 2 Tias paternas (Ca mama) | HBOC |
| Caso 20 | F | Ca mama bilateral (55a) cirurgia + QT (mama E) QT (mama D) | CCR (56a) cirurgia | Ca tireóide (60a) cirurgia | - | - | Mãe (Ca mama) Tia materna (desconhecido) Tia avó paterna (desconhecido) Bisavô paterno (CCR) Tio materno (Cabeça e pescoço) Sobrinho (Sistema nervoso central) | HBOC |
| Caso 21 | F | Ca mama D (36a) cirurgia | Ca mama E (40a) cirurgia + QT + RT | Melanoma (peitoral esquerdo) (49a) cirurgia | CCR (58a) tratamento paliativo | Ca pulmão (58a) cirurgia (metástase) | Tio materno (Cabeça e pescoço 60a) | HBOC |
| Caso 22 | F | Ca mama E (43a) cirurgia + QT | CCR (47a) cirurgia + QT | Ca ósseo (metástase) | Ca pulmão (metástase) | Ca fígado (metástase) | Avô materno (Ca duodeno) Tia materna (nódulos mamários, Ca tireóide) Irmão (adenoma colorretal) | HBOC/Síndrome Lynch |

| | | | | | | | | |
|---------|---|---|------------------------------------|----------------------------|---|---|---|---|
| Caso 24 | F | Ca mama (56a) cirurgia + QT + RT | CCR (62a) cirurgia + RT | - | - | - | Pai (Ca laringe) Mãe (Ca pulmão) Avó materna (Ca mama) | Não preenche critérios |
| Caso 25 | F | Ca mama (65a) | CCR (76 a) | - | - | - | Irmão (Ca pulmão 82a) óbito Pai (Ca pâncreas) Mãe (Ca útero) Tio materno (Melanoma) Irmã (Ca mama 48a) óbito Prima paterna (Ca mama) Tia materna (Ca gástrico) Avô paterno (Ca esôfago) | HBOC |
| Caso 26 | F | CCR (40a) Cirurgia + QT | Ca mama D (43a) cirurgia + QT + RT | Ca estômago (44a) cirurgia | - | - | Irmã (Ca mama 46a) Pai (Ca pulmão 74a)_óbito Avô Paterno(Ca cabeça e pescoço 74a)_óbito Avô materno (Ca cabeça e pescoço 72a)_óbito Avó materna (Ca útero 63a)_óbito Mãe (ca estômago 69a) Tio materno (Ca estômago 69a e 77a) Tio paterno (Ca pulmão 51a e Ca pele 60a) Tia paterna (Leucemia 18a)_óbito Tia materna (Ca mama 48a) Tia paterna CCR 70a) Tio paterno (Ca fígado 78a) Tio paterno (Leucemia 72a) Prima paterna (Ca mama 45a) Tia materna (Ca mama 47a) Primo paterno (melanoma 30a) Prima materna (Ca mama 34a) Primo materno (Sarcoma 48a)_óbito Primo materno (Vários tumores; metástase 40a)_óbito. | HBOC/Síndrome Lynch/Síndrome Li Fraumeni (Chompret) |
| Caso 27 | F | CCR (59a) Cirurgia ^a + QT+ RT | Ca mama (64a) cirurgia + QT+ RT | Ca pâncreas (86a) cirurgia | - | - | Mãe (Ca útero 60a) Irmão (CCR 50a) | Não preenche critérios |

Ca= câncer; **CCR=** Câncer colorretal; **CEC=** Carcinoma espinocelular; **SPM=** Sarcoma de partes moles; **SNC=** Sistema nervoso central; **D=** Direita; **E=** Esquerda; **QT=** Quimioterapia; **RT=** Radioterapia; **HBOC:** síndrome do cancer de mama e ovário hereditários. *Alguns dados clínicos como a idade do aparecimento dos tumores em alguns familiares não foram informados; ^a cirurgia realizada em outro serviço.

4.2 EXTRAÇÃO DE DNA

A extração do DNA foi realizada a partir de linfócitos do sangue periférico pela equipe técnica do Banco de Macromoléculas do A.C.Camargo Cancer Center, SP. O DNA foi extraído utilizando o Qiacube DNA Blood kit (Qiagen), segundo as recomendações do fabricante, e posteriormente armazenado a - 20°C. O DNA foi quantificado no sistema NanoDrop ND 1000 (Thermo Scientific) e a qualidade foi verificada utilizando eletroforese em gel de agarose a 1.5%, conforme protocolos padrão. Antes do sequenciamento, o DNA foi quantificado e sua integridade avaliada pelo sistema *Qubit Fluorometric Quantification* (Thermo Fisher).

4.3 SEQUENCIAMENTO DO EXOMA TOTAL (SET)

O sequenciamento do exoma foi realizado junto ao *Department of Clinical Genetics, University Hospital of Southern Denmark, Institute of Regional Health Research, University of Southern Denmark, DK*.

4.3.1 Construção das Bibliotecas do Exoma

A integridade do DNA foi avaliada usando o ensaio Agilent Genomic DNA ScreenTape (Agilent, Santa Clara, CA). Para a construção das bibliotecas de exoma foi utilizado o kit TruSeqRapid Exome (Illumina) de acordo com as recomendações do fabricante. O sequenciamento foi realizado a partir do equipamento NextSeq 500 (Illumina, San Diego, CA).

O protocolo inclui os seguintes passos (1) fragmentação do DNA genômico, ligação e tagmentação de adaptadores, (2) limpeza do produto tagmentado, (3) amplificação do DNA tagmentado, (4) limpeza do produto amplificado pela PCR, (5) hibridação de sondas, (6) captura de sondas hibridadas, (7) segunda hibridação e captura, (8) limpeza das bibliotecas capturadas, (9) amplificação das bibliotecas enriquecidas, (10) limpeza do produto amplificado pela PCR. Estas etapas estão descritas abaixo, em detalhes.

Fragmentação do DNA, ligação e tagmentação de adaptadores. As amostras foram diluídas para uma concentração inicial de 50 ng de DNA genômico (5 ng/ μ L). Para a quantificação foi utilizado o Kit Qubit® dsDNA BR Assay no Qubit® 2.0 Fluorometer (Life Technologies). A fragmentação do DNA e a ligação dos adaptadores ocorreu a partir da adição de 25 μ L de Tagment DNA Buffer e 15 μ L de Tagment DNA Enzyme 2. As amostras foram homogeneizadas a 1800 rpm por um minuto e centrifugadas a 280xg por mais um minuto. Em seguida, foram incubadas a 58°C por 10 minutos e posteriormente adicionados 15 μ L de Stop Tagment Buffer, que inibe a ligação dos adaptadores. As amostras foram incubadas novamente a 60°C por 5 minutos.

Limpeza do produto tagmentado. Esta etapa usa uma solução de limpeza, a Sample Purification Beads, para purificar o DNA tagmentado que pode se permanecer na reação, ligar-se às extremidades do DNA e interferir nas reações posteriores. Foram adicionadas e homogeneizadas 52 μ L de Sample Purification Beads (SPB) e incubadas por cinco minutos à temperatura ambiente e por dois minutos (ou até o sobrenadante ficar claro) em raque magnética. Foram transferidos 98 μ L do sobrenadante para um novo tubo e novamente adicionados 137 μ L de SPB

e homogeneizadas. Incubou-se por cinco minutos a temperatura ambiente e por dois minutos (ou até o sobrenadante ficar claro) em raque magnética. Em seguida foram descartados os sobrenadantes e, sem perturbar as beads, foi realizada a lavagem por duas vezes adicionando 200 μL de etanol 80% (EtOH 80%) e incubando por 30 segundos. Após remoção do sobrenadante, as amostras foram incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente na raque magnética para secagem das beads. O DNA tagmentado purificado foi ressuspensionado em 22,5 μL de Resuspension Buffer (RSB). Em seguida, foi incubado por dois minutos à temperatura ambiente e dois minutos (ou até o sobrenadante ficar claro) na raque magnética. Foram transferidos 20 μL do sobrenadante para tubos de PCR.

Amplificação do DNA tagmentado. Esta etapa amplifica o DNA tagmentado purificado e adiciona adaptadores “Index 1” e “Index 2” usando um programa de PCR de 10 ciclos. Foram adicionados 5 μL de Index 1, 5 μL de Index 2 e 20 μL de Library Amplification Mix (LAM). O produto foi homogeneizado a 1200 rpm por um minuto e centrifugado a 280xg por um minuto. Em seguida, a amplificação pela PCR ocorreu usando o programa de 72°C por três minutos, 98°C por 30 segundos, 10 ciclos (98°C por 10 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos), 72°C por cinco minutos e então mantidas a 10°C.

Limpeza do produto amplificado pela PCR. A biblioteca de DNA foi purificada para a remoção de produtos indesejáveis. As amostras foram removidas do termociclador e centrifugadas por um minuto a 280xg. Foram adicionados 90 μL de SPB aos 50 μL de amostra sendo homogeneizados por um minuto a 1800 rpm. As amostras foram incubadas a temperatura ambiente por cinco minutos e em seguida por dois minutos (ou até o sobrenadante ficar claro) em raque magnética. Após o

descarte do sobrenadante, foram adicionados 200 μL de EtOH 80% e as amostras incubadas por 30 segundos. Em seguida, foi realizada mais uma lavagem com EtOH 80% nas mesmas condições. As amostras foram incubadas novamente à temperatura ambiente em raque magnética por 5 minutos para secagem das *beads*. O DNA amplificado e purificado foi ressuspensionado em 17 μL de RSB. As amostras foram incubadas a temperatura ambiente por dois minutos e em raque magnética por dois minutos (ou até o sobrenadante ficar claro). Foram transferidos 15 μL do sobrenadante para um novo tubo para que a biblioteca seja quantificada novamente pelo método fluorimétrico Qubit, como citado no início deste protocolo.

Hibridação de sondas. Nesta etapa a biblioteca de DNA foi hibridada com sondas biotinizadas responsáveis por capturar as regiões alvos de interesse (exons). Primeiramente, as amostras (concentração de 500 ng) foram combinadas em pool, no qual cada um deles continha seis amostras e um volume final de 30 μL . Foram adicionados 10 μL de Blocker (BLR) e 10 μL de Coding Exome Oligos (CEX) em cada pool de amostras. Após homogeneização (1200rpm por um minuto) e centrifugação (280xg por um minuto), foram adicionados 125 μL de SPB, homogeneizadas a 1880rpm por um minuto e centrifugadas (280xg por um minuto). As amostras foram incubadas à temperatura ambiente por cinco minutos e em seguida por dois minutos (ou até o sobrenadante ficar claro) em raque magnética. Após o descarte do sobrenadante, foram adicionados 200 μL de EtOH 80% e as amostras incubadas por 30 segundos. Em seguida, foi realizada mais uma lavagem com EtOH 80% nas mesmas condições. O pool de amostras foi deixado por 10 minutos para a secagem das beads e então foram adicionados 7,7 μL de Enrichment Hybridization Buffer 1 (EHB1) e homogeneizados a 1800 rpm por um minuto. Os

tubos foram removidos da raque magnética e incubados por dois minutos à temperatura ambiente e em seguida centrifugados (280xg por um minuto). Foram novamente colocados na raque magnética, até o líquido estar claro, e então foram transferidos 7,5 μ L do sobrenadante para uma placa. Foram adicionados 2,5 μ L de Enrichment Hybridization Buffer 2 (EHB2), homogeneizados a 1800 rpm e centrifugados a 280xg por um minuto. A seguir, o pool de amostras foi incubado em termociclador a 95°C por 10 minutos, 58°C por 30 minutos.

Captura de sondas hibridadas. As sondas biotiniladas hibridadas para as regiões alvo de interesse foram capturadas a partir de beads magnéticas marcadas com estreptavidina. O produto passou por processos de lavagens para que ligações não específicas fossem removidas e a biblioteca enriquecida pudesse ser eluída e preparada para uma segunda etapa de hibridação. O pool de amostras foi retirado do termociclador, centrifugado por um minuto a 280xg sendo adicionados 250 μ L de Streptavidin Magnetic Beads (SMB). Após homogeneização por cinco minutos a 1200rpm, procedeu-se a incubação à temperatura ambiente por 25 minutos e centrifugação a 280xg por um minuto. Em seguida foram incubados em raque magnética por dois minutos (ou até o sobrenadante ficar claro) e o sobrenadante foi descartado. Foram então adicionados 200 μ L de Enrichment Wash Solution (EWS) aos pools e estes homogeneizados a 1800 rpm por quatro minutos. As amostras foram incubadas a 50°C por 30 minutos e em raque magnética por mais dois minutos (ou até o sobrenadante ficar claro). Em seguida, o sobrenadante foi descartado. Esse passo de lavagem com EWS seguido das duas incubações e descarte do sobrenadante foi repetido. Em seguida, 23 μ L de uma solução de pré-eluição (28,5 μ L de Enrichment Elution Buffer 1 - EE1 e 1,5 μ L de 2N NaOH) foram adicionados e

homogeneizados ao pool de amostras por dois minutos a 1800 rpm. Este foi incubado a temperatura ambiente por dois minutos e em raque magnética por mais dois minutos (ou até o sobrenadante ficar claro). Foram transferidos 21 μL do sobrenadante para um novo tubo com 4 μL de Elute Target Buffer 2 (ET2), homogeneizados a 1200 rpm por um minuto e centrifugados por 280xg por um minuto. Em seguida, foram adicionados 5 μL de RSB e novamente homogeneizados por cinco minutos a 1200rpm, e centrifugados a 280xg por um minuto.

Segunda hibridação e captura. Os passos da segunda hibridação e captura são os mesmos descritos acima. A repetição deste processo assegura alta especificidade das regiões capturadas.

Limpeza das bibliotecas capturadas. Foram adicionados ao pool de amostras 45 μL de SPB e estes foram homogeneizados a 1800 rpm por um minuto e então centrifugados a 280xg por um minuto. Em seguida, foram incubados por 10 minutos a temperatura ambiente e na raque magnética por dois minutos (ou até o sobrenadante ficar claro). O sobrenadante foi descartado e 200 μL de EtOH 80% foram adicionados e incubados por 30 segundos. Novamente o sobrenadante foi removido e esta etapa de lavagem foi repetida. Todo o excesso de etanol foi removido e as amostras foram incubadas em raque magnética por 5 minutos até secarem completamente. Em seguida, as amostras foram transferidas para raque normal e ressuspendidas em 27,5 μL de RSB e homogeneizadas a 1800 rpm por um minuto. As amostras foram incubadas em temperatura ambiente por dois minutos e em raque magnética por dois minutos (ou até o sobrenadante ficar claro), sendo então transferidos 25 μL do sobrenadante para um novo tubo.

Amplificação das bibliotecas enriquecidas. A biblioteca de DNA purificada foi amplificada utilizando PCR convencional. Foram adicionados ao pool de amostras 5 μL de PCR Primer Cocktail Mix (PPC) e 20 μL de Enrichment Amplification Mix (EAM). Após homogeneização a 1200rpm por um minuto e centrifugação a 280xg por um minuto, as amostras foram incubadas em termociclador a 98°C por 30 segundos, 10 ciclos de (98°C por 10 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos), 72°C por cinco minutos e 10°C ∞ .

Limpeza do produto amplificado pela PCR. A biblioteca de DNA foi purificada para a remoção de produtos indesejáveis. As amostras foram removidas do termociclador e centrifugadas por um minuto a 280xg. Foram adicionados 50 μL de SPB aos 50 μL de amostra sendo a solução homogeneizada por um minuto a 1800 rpm. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente por cinco minutos e em seguida por dois minutos (ou até o sobrenadante ficar claro) na raque magnética. Após a remoção do sobrenadante, foram adicionados 200 μL de EtOH 80% e as amostras incubadas por 30 segundos. Em seguida, foi realizada nova lavagem com EtOH 80% nas mesmas condições. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente na raque magnética por cinco minutos para secagem das beads. O DNA amplificado e purificado foi ressuscitado a partir da homogeneização com 32 μL de RSB. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente por dois minutos e em raque magnética por dois minutos (ou até o sobrenadante ficar claro). Foram transferidos 30 μL do sobrenadante para ser submetido à etapa de sequenciamento do exoma. Após a limpeza do produto amplificado, foi avaliada a qualidade da biblioteca. O DNA foi quantificado pelo Qubit dsDNA e a concentração foi convertida de ng/ μL para nM. Utilizou-se o Agilent Genomic DNA ScreenTape

(Agilent, Santa Clara, CA), para avaliar os tamanhos dos fragmentos que deveriam estar entre 200 a 400 pb.

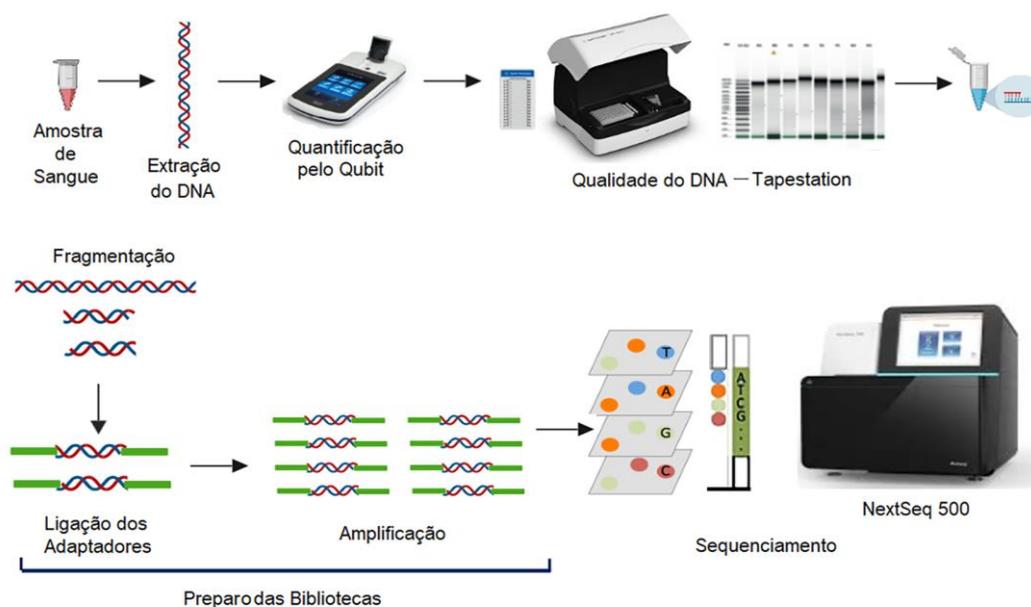
4.3.2 Pré-Sequenciamento e Sequenciamento do Exoma

O sequenciador NextSeq 500 (Illumina) permite obter uma precisão de > 75% de bases sequenciadas acima de 99,9% a 2×150 pb. Esta precisão, associada a grande quantidade de sequências por flowcell, pode determinar alta cobertura. A cobertura é extremamente importante para se garantir dados fidedignos, que representem informações biologicamente corretas, reproduzíveis e que possam ser confirmados por experimentos de validação adequados.

A clusterização e o sequenciamento foram realizados no próprio sequenciador Nextseq 500. Durante a clusterização, moléculas de DNA em fita simples são ligadas à flowcell e, em seguida, amplificadas para formar clusters. Na flowcell estão plotadas as sondas, que são iniciadores, correspondentes às sequências contidas nos adaptadores utilizados na construção das bibliotecas. Na etapa de clusterização, ocorre a amplificação em ponte a partir dos iniciadores.

O sequenciamento ocorre logo após a clusterização. Na etapa de sequenciamento também há amplificação de moléculas de DNA contidas nos clusters, porém os nucleotídeos incorporados possuem bases marcadas com fluoróforos, sendo cada base correspondente a uma cor diferente. A cada ciclo uma base com fluoróforo é incorporada, a imagem do cluster é registrada e é retirado o fluoróforo juntamente com o agente terminador da cadeia crescente de DNA para que um novo ciclo se inicie. À medida que cada base é incorporada à cadeia crescente de DNA, o cluster emite uma fluorescência correspondente à base e assim,

sucessivamente até o completo sequenciamento dos fragmentos (300 pares de base em corrida *paired-end*). Os sinais fluorescentes são lidos e interpretados por software específico, possibilitando a construção da sequência. Todos os procedimentos seguiram as recomendações do fabricante (Figura 1).



Fonte: Imagem gerada pelo Biorender (<https://biorender.com/>).

Figura 1 - Esquema representativo das principais etapas do processo de preparo das bibliotecas e sequenciamento.

Após o sequenciamento, as bases foram nomeadas (base-calling) e os dados extraídos utilizando os programas SAV (Software Analysis Viewer; https://support.illumina.com/sequencing/sequencing_software/sequencing_analysis_viewer_sav.html) e CASAVA (https://support.illumina.com/sequencing/sequencing_software/casava.html).

Em seguida, as amostras foram identificadas e separadas dos pools de amostras sequenciadas em cada *lane* (denominado de demultiplexação), transferidos e armazenados via download para o servidor do Laboratório para a análise de bioinformática.

✓ **Análise dos dados de Sequenciamento do Exoma**

O *pipeline* usado neste estudo para as análises de sequenciamento é baseado limpeza dos *reads*, mapeamento, marcação dos *reads* duplicados, identificação e filtragem das variantes. Este pipeline foi baseado nas recomendações do GATK Best Practice (<https://software.broadinstitute.org/gatk/best-practices/>). Os dados brutos foram pré-processados antes da identificação das variantes, na tentativa de melhor explorar e fazer uma correção técnica. Na primeira etapa os *reads* foram filtrados para a retirada das sequências dos adaptadores. Estas sequências são disponibilizadas pela empresa que comercializa o kit de preparo de biblioteca, uma vez que os adaptadores fazem parte da amplificação e captura do DNA genômico sequenciado.

Os *reads* são alinhados ao genoma de referência hg19 disponibilizada pelo UCSC Genome Browser (<http://hgdownload.cse.ucsc.edu/downloads.html>). Há uma série de parâmetros que devem ser observados com o intuito de selecionar os melhores alinhamentos, ou mais alto MapQscore. Neste processo foi utilizado o programa BWA-MEM que é o algoritmo do BWA (<http://bio-bwa.sourceforge.net/>), ideal para sequências de 70bp a 1Mbp, sendo mais rápido, acurado o qual permite a seleção de leituras de alta qualidade (LI e DURBIN 2009). O BWA possui uma função de *soft clipping* (clivagem discreta), que elimina bases de menor qualidade das extremidades das leituras. Outra etapa importante é a seleção das leituras em pares. O sequenciamento do tipo *paired-end* permite que os usuários sequenciem as duas extremidades de um fragmento e gerem dados de sequência alinhados e de alta qualidade. Essa técnica facilita a detecção de rearranjos genômicos e elementos de sequência repetitiva, bem como fusões de genes e novos transcritos. Além de produzir o dobro do número de leituras pelo mesmo tempo e esforço na preparação

da biblioteca, as sequências alinhadas como pares de leitura permitem um alinhamento mais preciso e a capacidade de detectar variantes de inserção-deleção (indel), o que não é possível com a leitura única. Por questões técnicas, ainda há dificuldade para gerar leituras de grande tamanho pelos sequenciadores de nova geração, por isso são realizadas leituras de fragmentos de 300 pares de base, por exemplo, em duas fases: na primeira lê-se 150 pares de base assim como na segunda, porém na direção oposta.

A marcação das leituras duplicadas, também conhecido como deduplicação, é essencial para as boas práticas de análise de dados genômicos, pois esta marcação faz com que seja incluída uma *flag* (etiqueta) nas leituras mapeadas. Estas sequências resultam na amplificação de uma determinada região por artefatos de sequenciamento que não são informativos no resultado final de identificação das variantes. No entanto, estas *reads* não são retiradas neste momento, apenas são ignoradas na etapa de chamada de variantes pela análise padrão feita pelo GATK (WANG et al. 2010; DEPRISTO et al. 2011). Essa ferramenta localiza e identifica leituras duplicadas em um arquivo BAM ou SAM, em que leituras duplicadas são definidas como originárias de um único fragmento de DNA. Podem surgir duplicatas durante a preparação da amostra, ou seja, na construção de biblioteca usando PCR. Após a fase de duplicação são iniciadas etapas de análises detalhadas de acordo com as recomendações GATK (<http://software.broadinstitute.org/gatk/bestpractices>). Estas recomendações são divididas em três etapas principais: pré-processamento, identificação das variantes e filtragem das variantes, o que resultará no arquivo final VCF (*variant call format*) padrão para a entrada nos programas de anotação. O pré-processamento consiste no ajuste fino dos dados de qualidade fornecidos pelo

sequenciador. O pré-processamento passa pela fase de construção de um modelo de variações envolvendo as leituras geradas pelo sequenciador e arquivos com o conjunto de variantes conhecidas. Os dados de qualidade de cada base passam por um ajuste de re-calibragem com base no modelo previamente construído.

A identificação e a filtragem das variantes estão interligadas com o intuito de alcançar o mesmo objetivo, chamar as variantes com alta sensibilidade e especificidade e diminuir o número de falso-negativos e falso-positivos. A chamada de variantes (*variants calling*) é realizada com base na comparação entre as *reads* geradas e o genoma de referência. São consideradas as bases que diferem do genoma de referência, ou seja, as variantes a serem identificadas. Após isso o GATK sugere que os diferentes arquivos VCF gerados para cada amostra sejam unidos de modo que possa haver uma comparação entre as variantes identificadas em todo o grupo amostral, assim aumentando a sensibilidade (CINGOLANI et. al. 2012).

A especificidade é aumentada na fase de filtragem, cujo realinhamento é realizado nas variantes previamente identificadas. O programa utiliza referências altamente curadas e bem estabelecidas contendo variantes conhecidas. Assim as alterações identificadas nas amostras sequenciadas são comparadas com estes sítios conhecidos e filtrados.

Além das etapas consideradas “padrão” para chamada de variantes existe uma série de refinamentos que podem ser realizados posteriormente. Estas análises resultam comumente numa grande quantidade de variantes candidatas. A seleção das variantes de interesse deve então ser norteadas pelas informações do fenótipo em estudo.

Após esse processo de alinhamento e limpeza dos *reads*, foi utilizado o software VarSeq 2.1.0 (*Golden Helix, USA*) definindo-se os filtros para a seleção de variantes germinativas. Em nosso estudo, foram usados os seguintes filtros: frequência de alelos $< 0,02$ nas populações (*gnomAD Genomes, gnomAD Exomes e inhouse ABRaOM*); Zigosidade: variantes heterozigotas ou homozigotas; exclusão das variantes classificadas como benignas ou provavelmente benignas pelo ACMG e *Clinical Genome Resource-ClinVar*; Frequência do alelo variante $> 0,2$ no sequenciamento; Filtros de qualidade: strand Bias-Fisher (FS) < 30 (BECKER et al. 2004; RICHARDS et al. 2015; LEK et al. 2016).

Uma vez determinados os filtros, a próxima etapa foi a checagem manual (alteração por alteração) usando o *Genome Browse* para analisar se o sequenciamento era confiável. Para esta análise foram realizados os seguintes passos: checagem das *reads* em cada uma das variantes selecionadas (*strand bias*), o viés da fita ocorre quando o genótipo deduz as informações apresentadas pela fita direta e a fita reversa discorda. Por exemplo, em uma determinada posição no genoma, as leituras mapeadas para a cadeia direta suportam um genótipo heterozigoto, enquanto as leituras mapeadas para a cadeia reversa suportam um genótipo homozigoto, avaliação da presença de homopolímeros, os quais são excluídos se mais de seis nucleotídeos iguais forem detectados; avaliação da quantidade de *reads* que suportam a variante; análise das variantes no ClinVar e ACMG e os estudos que suportam a classificação da variante. Quando a variante passa por todos esses critérios ela é considerada uma “*True Positive*” (Figura 1).

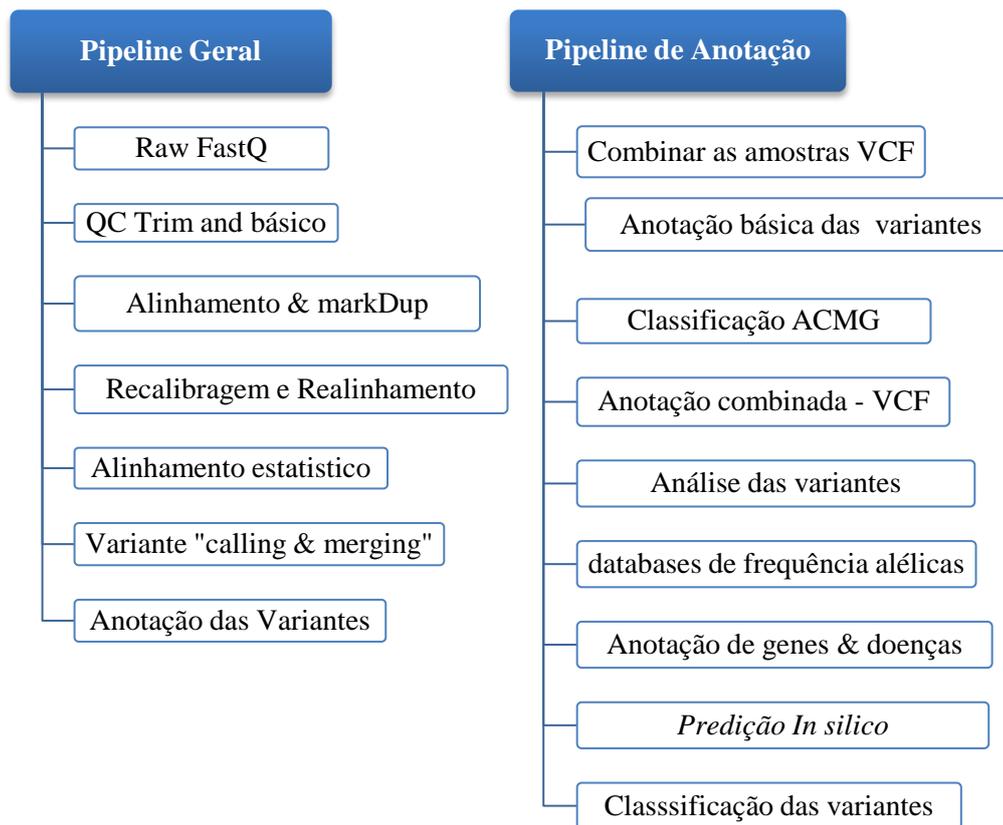


Figura 2 - Resumo do *pipeline* utilizado para análise do sequenciamento do exoma relacionado a variantes germinativas em amostras de pacientes com carcinomas de mama e colorretal. Este pipeline é baseado na análise de variantes raras e positivas (*true positive*) e que tenham potencial significado clínico.

✓ **Confirmação das Alterações**

Foi utilizado o NextSeq 500 (Illumina, San Diego, CA), conforme instruções do fabricante. As análises de bioinformática foram feitas em colaboração com a equipe do Dept of Clinical Genetics Dept, Vejle Hospital, SDU, DK. A análise das sequências foram realizadas utilizando o software VarSeq 2.1.0 (Golden Helix, USA) sendo removidas as reads não sequenciadas pelas duas fitas utilizadas durante o sequenciamento (strand Bias-Fisher – FS <30). As variantes foram anotadas utilizando os programas ANNOVAR, GATK e SnpEFF e classificadas utilizando o ACMG em 2018. As variantes identificadas foram comparadas com outros bancos de

dados em relação a frequência (gnomAD Genomes, gnomAD Exomes e ABRaOM), descrição do gene e associação com doença (RefSeq, dbNSFP e OMIM), e classificação das variantes (ClinVar, ACMG e InterVar). Foram utilizados como critério de seleção: variantes heterozigotas ou homozigotas, frequência do alelo variante $> 0,2$ no sequenciamento e $< 0,02$ nas populações em geral. Foram excluídas as variantes benignas ou likely-benignas pelo ACMG. As demais variantes foram curadas manualmente usando o GenomeBrowse (Golden Helix Inc., EUA) mantendo os seguintes parâmetros: variantes cobertas por pelo menos 10 *reads* os quais deveriam estar presentes em ambas as fitas (*Foward* e *Reverse*) e não presentes em regiões de homopolímeros (foram excluídas variantes com mais de seis nucleotídeos iguais incorporados a sequência).

O caso 4 foi avaliado por sequenciamento de Sanger para confirmar a presença das variantes detectadas nos genes *MUTYH* (c.1187G>A) e *APC* (c.465delA), respectivamente. Para o sequenciamento de Sanger, o DNA foi amplificado pela PCR utilizando o kit Qiagen Multiplex PCR Master Mix (Qiagen), seguindo as recomendações do fabricante. Resumidamente, foram adicionados 5 μ L de 2X Qiagen Multiplex PCR Master Mix; 2 μ L de 10X Primer mix, 2 μ M cada iniciador (*MUTYH*: F: TCACTTACCTCCCCAAGGTG e R: AAATTCTGCTGGTGCAGAGG; *APC*: F: CTTGCTGATCTTGACAAA e R: GCCAAGTTACTTACATTTTC); 2,5 μ L de água e 0,5 μ L de DNA. As condições da reação foram: 95°C por 15 minutos, 34 ciclos de 94°C por 30 segundos, 62°C por 90 segundos e 72°C por 30 segundos e extensão final de 72°C por 10 minutos. O produto da PCR e os controles positivo e negativo foram avaliados usando Agilent D1000 Screen Tape (Agilent, Germany). O produto foi tratado com 2 μ L de

ExoProStar™ 1-Step (GE Healthcare Life Sciences) e 5uL do produto de PCR. O mix de pré-sequenciamento foi preparado usando o kit BigDye™ Terminator v1.1 Cycle Sequencing (Thermo Fischer), de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram preparadas para a eletroforese a partir do kit BigDye XTerminator® Purification (Thermo Fisher) usando 45uL de SAM™ Solution and 10ul de XTerminator™ Solution por amostra. As amostras foram homogeneizadas duas vezes a cada 15 minutos e sequenciadas pelo *ABI 3130 Genetic Analyzer* (Thermo Fisher). Para a análise dos dados foi utilizado o *CLC Genomics Workbench* (CLC bio).

5 RESULTADOS

Foram sequenciadas as amostras de sangue periférico de 20 pacientes selecionados, os quais apresentaram câncer de mama e colorretal como tumores primários. Entre estes casos, três apresentaram uma cobertura média de 30X inferior a 40% (casos 1, 2 e 4) e foram utilizados para as comparações com as alterações encontradas nos demais casos ou foram considerados quando detectadas alterações patogênicas de relevância para o fenótipo. A cobertura do sequenciamento do exoma descreve o número médio de *reads* que se alinham ou "cobrem" as bases de referência conhecidas. O nível de cobertura do sequenciamento geralmente determina se a descoberta de variantes pode ser feita com um certo grau de confiança em determinadas posições da base. Em níveis mais altos de cobertura, cada base é coberta por um número maior de *reads* de sequência alinhadas, para que as bases chamadas possam ser feitas com um maior grau de confiança. Os dados da cobertura média para cada amostra sequenciada para o exoma total estão apresentados na **Tabela 1**.

Tabela 1 - Resumo dos resultados da cobertura média após o sequenciamento do exoma e número de variantes obtidas após a análise detalhada dos 20 pacientes.

| ID | Média (x) | % - 1x | % - 20x | % - 30x | Número de variantes filtradas | |
|----------------|-----------|--------|---------|---------|-------------------------------|-----|
| | | | | | L+LP | VUS |
| 1 ^a | 22,7 | 87,6 | 31,0 | 23,6 | 1 | 2 |
| 2 ^a | 18,8 | 92,3 | 31,6 | 19,6 | 1 | 5 |
| 4 ^a | 30,5 | 93,5 | 47,3 | 33,6 | 4 | 1 |
| 5 | 41,90 | 94,1 | 57,2 | 43,6 | 1 | 256 |
| 8 | 45,45 | 93,8 | 61,3 | 48,2 | 4 | 240 |
| 12 | 51,87 | 94,0 | 67,3 | 54,4 | 0 | 291 |
| 13 | 58,63 | 94,2 | 67,6 | 56,0 | 3 | 266 |
| 14 | 58,97 | 97,7 | 82,0 | 71,4 | 0 | 224 |
| 15 | 54,69 | 97,8 | 83,9 | 73,5 | 6 | 299 |
| 16 | 67,58 | 97,7 | 84,1 | 74,9 | 2 | 259 |
| 17 | 54,99 | 98,0 | 85,9 | 75,4 | 2 | 279 |
| 18 | 87,04 | 97,8 | 87,6 | 80,5 | 1 | 275 |
| 19 | 79,91 | 97,8 | 88,1 | 80,5 | 0 | 249 |
| 20 | 80,41 | 98,0 | 88,9 | 82,1 | 2 | 273 |
| 21 | 84,94 | 98,0 | 89,1 | 82,1 | 1 | 278 |
| 22 | 79,74 | 98,2 | 89,6 | 82,8 | 3 | 260 |
| 24 | 87,76 | 98,0 | 90,0 | 83,2 | 3 | 299 |
| 25 | 90,90 | 97,9 | 90,5 | 85,1 | 0 | 237 |
| 26 | 99,13 | 98,3 | 92,3 | 87,2 | 1 | 212 |
| 27 | 113,19 | 98,3 | 93,6 | 89,6 | 3 | 327 |

^a casos com cobertura média de 30X inferior a 40%. Estas amostras foram analisadas para comparações com os demais casos.

As diretrizes para a classificação das variantes em termos de significância clínica, foram determinadas pelo ACMG (RICHARDS et al. 2015) sendo também consultado o ClinVar (<https://www.clinicalgenome.org>). Foram identificadas 4869 variantes entre os 20 probandos, sendo 39 classificadas como patogênicas (P) ou provavelmente patogênicas (LP) e 4830 como variantes de significado incerto (VUS). Cinco casos-índice (Casos 1, 12, 14 e 25) não apresentaram variantes P ou LP. Todos os casos apresentaram variantes de significado incerto.

O Quadro 2 apresenta todas as alterações classificadas como patogênicas e provavelmente patogênicas (ACMG e ou ClinVar), incluindo a identificação da

amostra, o gene e sua variante, tipo e efeito ao qual a variante está associada. Considerando apenas a classificação do ACMG, foram identificadas quatro variantes patogênicas: *APC* (caso 4), *PLA2G6* (caso 8), *SGCB* (caso 17) e *GLB1* (caso 24).

Foram também identificadas variantes provavelmente patogênicas segundo o ACMG. A presença de variantes LP foi detectada nos genes *MUTYH* (caso 4); *LAMA1* (caso 5); *DST*, *IMPAD1* e *SYNE1* (caso 8); *SLC3A1*, *DNAH11*, *MFF* e *SLC26A4* (caso 13); *TRNT1* (caso 16); *CYP11B1* (caso 18); *TRIOBP* (caso 20); *SPATA5* (caso 21); *CEP104*, *CRYAA* e *MLH1* (caso 22); *CSPP1* (caso 24) e *DDX11* e *DNAJC21* (caso 27) (Quadro 2).

Os genes conhecidos em síndromes hereditárias associadas ao carcinoma colorretal foram investigados entre as variantes detectadas (L, LP e VUS) nos casos-índice (Quadro 2). O caso 4 apresentou uma mutação patogênica no *APC* (c.465delA; p.Asp156Thrfs*14) e uma LP no gene *MUTYH* (c.1187G>A; p.Gly396Asp). A variante no gene *MUTYH* (c.1187G>A) foi confirmada por sequenciamento de Sanger enquanto a variante no gene *APC* foi considerada falso positiva.

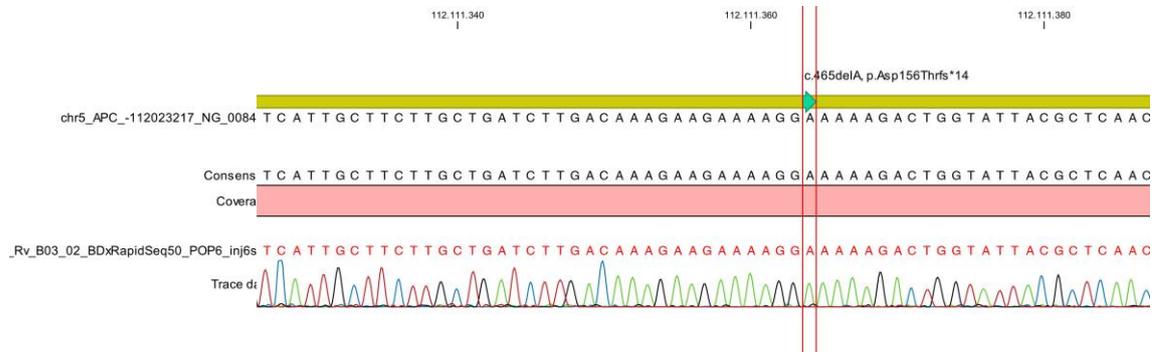
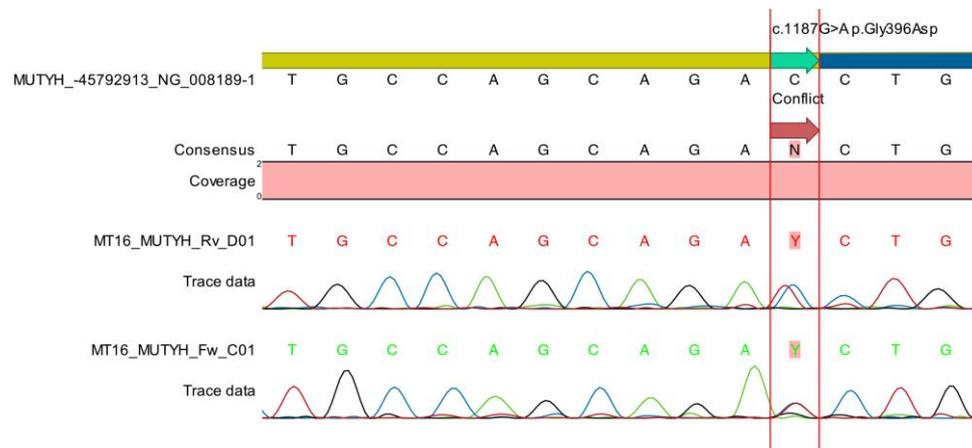
A**B**

Figura 3 - Eletroferogramas representativos das variantes patogênica e provavelmente patogênica detectadas no caso 4 por sequenciamento do exoma (SET). (A) A variante patogênica detectada por SET no gene *APC* (c.465delA) não foi detectada por sequenciamento de Sanger. (B). A variante LP no gene *MUTYH* c.1187G>A foi confirmada.

Entre as três variantes identificadas no caso 22, a variante do *MLH1* (c.1852_1853insTTCT; p.Lys618Ilefs*4) foi classificada como LP. A paciente tinha história de câncer de mama (43a) e CCR (47a), apresentou metástases óssea, pulmonar e de fígado. Foi relatada história familiar de câncer de duodeno (avô materno), câncer de tireóide e nódulos mamários (tia materna) e o irmão apresentou adenoma colorretal (Figura 3). Os heredogramas representativos da história familiar das pacientes dos casos 4 e 22 estão ilustrados na Figura 4.

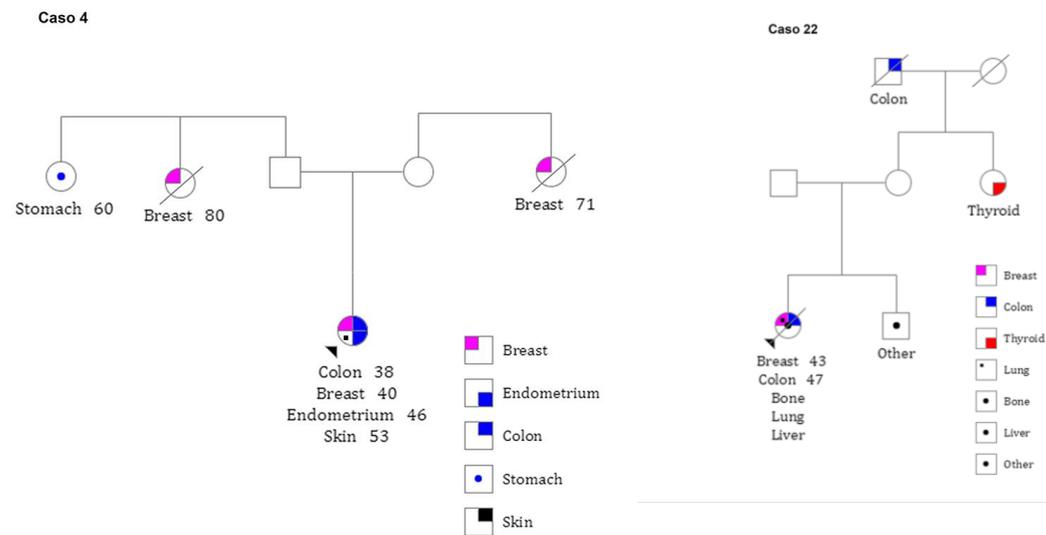


Figura 4 - Heredogramas representativos dos casos 4 e 22, os quais têm história de câncer de mama e ou colorretal na família. A paciente 4 apresentou uma variante patogênica em *APC* c.465delA e LP nos genes *MUTYH* c.1187G>A (caso 4). A paciente 22 apresentou uma variante LP no gene *MLH1* c.1852_1853insTTCT.

Quadro 2- Variantes classificadas como patogênicas (P) e provavelmente patogênicas (LP) detectadas entre os 20 pacientes incluídos no estudo.

| AMOSTRA | GENE | TROCA DE BASE | TROCA DE AMINOÁCIDO | TIPO/EFEITO | ACMG CLASSIFICAÇÃO | ClinVar CLASSIFICAÇÃO |
|---------------------|---------------------------|------------------------------|---------------------|-----------------------|--------------------|-----------------------|
| Caso 2 ^a | <i>ASL</i> | c.35G>A | p.Arg12Gln | <i>missense</i> | VUS/Conflitante | LP |
| Caso 4 ^a | <i>APC</i> ^b | c.465delA | p.Asp156Thrfs*14 | <i>frameshift/LoF</i> | P | P |
| | <i>BMP4</i> | c.272C>G | p.Ser91Cys | <i>missense</i> | VUS/P fraca | P |
| | <i>MUTYH</i> ^d | c.1187G>A | p.Gly396Asp | <i>missense</i> | LP | LP |
| | <i>MUTYH</i> | c.1147delC | p.Ala385Profs*23 | <i>frameshift/LoF</i> | VUS/P fraca | LP |
| Caso 5 | <i>LAMA1</i> | p.Glu1114Argfs*54 | p.Glu1114Argfs*54 | <i>frameshift/LoF</i> | LP | - |
| | <i>PHEX</i> | c.1952G>A | p.Arg651Gln | <i>missense</i> | LP | - |
| Caso 8 | <i>DST</i> | c.5848G>T | p.Glu1950Ter | <i>stop/LoF</i> | LP | - |
| | <i>IMPAD1</i> | c.646+1G>T | - | <i>splice/LoF</i> | LP | - |
| | <i>SYNE1</i> | c.4065_4068delCAAA | p.Asn1355Lysfs*4 | <i>frameshift/LoF</i> | LP | - |
| | <i>SYNE4</i> | c.699G>A | p.Trp233Ter | <i>stop/LoF</i> | VUS/P fraca | LP |
| | <i>PLA2G6</i> | c.109C>T | p.Arg37Ter | <i>stop/LoF</i> | P | P |
| Caso 13 | <i>PTGIS</i> | c.824G>A | p.Arg275Gln | <i>missense</i> | VUS/Conflitante | LP |
| | <i>SLC3A1</i> | c.1400T>C | p.Met467Thr | <i>missense</i> | LP | P |
| | <i>TACR3</i> | c.824G>A | p.Trp275Ter | <i>stop/LoF</i> | VUS/P fraca | LP |
| | <i>ALPL</i> | c.1559delT | p.Leu520Argfs | <i>frameshift/LoF</i> | VUS/P fraca | P |
| | <i>C9</i> | c.346C>T | p.Arg116Ter | <i>stop/LoF</i> | Benigna | P |
| | <i>DNAH11</i> | c.3425+2T>C | - | <i>splice/LoF</i> | LP | - |
| | <i>MFF</i> | c.38+1dupG | - | <i>splice/LoF</i> | LP | - |
| | <i>MFF</i> | c.518_518+1insACCTGTGTTGCGTG | p.Trp174Profs*31 | <i>frameshift/LoF</i> | LP | - |
| | <i>SLC26A4</i> | c.2074T>C | p.Phe692Leu | <i>missense</i> | LP | P |

Cont/ Quadro 2

| AMOSTRA | GENE | TROCA DE BASE | TROCA DE AMINOÁCIDO | TIPO/EFEITO | ACMG CLASSIFICAÇÃO | ClinVar CLASSIFICAÇÃO |
|---------|-----------------|----------------------------------|---------------------|------------------------|--------------------|-----------------------|
| Caso 16 | <i>RBP4</i> | c.111+1G>A | - | <i>splice/LoF</i> | VUS/P fraca | P |
| | <i>TRNT1</i> | c.498_501delATTT | p.Phe167Thrfs*9 | <i>frameshift/LoF</i> | LP | - |
| Caso 17 | <i>PADI3</i> | c.335T>A | p.Leu112His | <i>missense</i> | VUS/Conflitante | P |
| | <i>SGCB</i> | c.622-2A>G | - | <i>splice/LoF</i> | P | LP |
| Caso 18 | <i>CYP1B1</i> | c.1159G>A | p.Glu387Lys | <i>missense</i> | LP | P |
| Caso 20 | <i>MPO</i> | c.1555_1568delATGG AACCCAACCC | p.Met519Profs*21 | <i>frameshift/LoF</i> | VUS/Conflitante | LP |
| | <i>TRIOBP</i> | c.3682_3683insGC | p.Ser1228Cysfs*11 | <i>frameshift/LoF</i> | LP | - |
| Caso 21 | <i>SPATA5</i> | c.1612C>T | p.Arg538Ter | <i>stop/LoF</i> | LP | - |
| Caso 22 | <i>CEP104</i> | c.1317_1317+1delGG | - | <i>splice/LoF</i> | LP | - |
| | <i>CRYAA</i> | c.350G>A | p.Arg117His | <i>missense</i> | LP | - |
| | <i>MLH1</i> | c.1852_1853insTTCT | p.Lys618Ilefs*4 | <i>frameshift/LoF</i> | LP | - |
| Caso 24 | <i>CSPP1</i> | c.700G>T | p.Glu234Ter | <i>stop/LoF</i> | LP | |
| | <i>GLB1</i> | c.818G>T | p.Trp273Leu | <i>missense</i> | P | P |
| Caso 26 | <i>KIAA0586</i> | c.428delG | p.Arg143Lysfs*3 | <i>frameshift/LoF</i> | VUS/Conflitante | P |
| Caso 27 | <i>DDX11</i> | c.2458_2486del | p.Ser820Leufs*8 | <i>frameshift/LoF</i> | LP | - |
| | <i>DNAJC21</i> | c.868G>T | p.Glu290Ter | <i>stop/LoF</i> | LP | - |
| | <i>RDH12</i> | c.806_810delCCCTG | p.Ala269Glyfs*2 | <i>frameshift/LoF</i> | VUS/P fraca | P |

P: variante patogênica, **LP**: variante provavelmente patogênica, **P** fraca: fraco poder de patogenicidade; **B**: variante benigna, **LB**: variante provavelmente benigna, **LoF**: perda de função; **VUS**: variante de significado incerto. Os termos *missense* (sentido trocado), *frameshift/LoF* (deslocamento do módulo de leitura- perda de função), *splice /LoF* (sítio de splicing /perda de função), *stop/LoF* (códon de parada de leitura/perda de função) foi usado da nomenclatura inglesa. ^a casos com pequeno número de *reads* cujas alterações devem ser confirmadas, ^balteração confirmada como falso positiva por sequenciamento de Sanger.

Foram também pesquisados os genes associados com a síndrome de câncer de mama hereditário e comparados com as variantes detectadas na análise de sequenciamento do exoma. Estes dados encontram-se detalhados no Quadro 3. Dois probandos (casos 12 e 24) apresentaram variantes no gene *BRCA1* (uma classificada como VUS e outra como benigna). Na história familiar da paciente do caso 12 há vários parentes com câncer de mama, incluindo irmãs, filha e sobrinha; uma das irmãs teve câncer de ovário além do câncer de mama. Portanto a variante VUS do gene *BRCA1* poderia explicar este fenótipo.

Quadro 3 - Variantes identificadas (patogênicas, provavelmente patogênicas e de significado incerto) em genes descritos em síndromes associadas ao câncer de mama hereditário.

| Gene | Risco de câncer de mama | Outros cânceres associados | Paciente /variante |
|---------------|-------------------------|--|---|
| <i>ATM</i> | Moderado | Indeterminado/pouca evidência para câncer de próstata, pâncreas e colorretal | Caso 16/VUS-Conflitante (c.6443A>T; p.Lys2148Ile) |
| <i>BRCA1</i> | Alto | Próstata | Caso 12/VUS-B (p.Met1783Thr) Caso 24/VUS-B (p.Ala1615Thr) |
| <i>BRCA2</i> | Alto | Próstata, Pâncreas, Melanoma | - |
| <i>BRIP1</i> | Baixo | - | - |
| <i>CDH1</i> | Alto | Gástrico Difuso | - |
| <i>CHEK2</i> | Moderado | Colorretal | - |
| <i>MSH6</i> | Indeterminado | Colorretal e Endométrio | Caso 20/ VUS-P fraca (c.3974A>T; p.Lys1325Met) Caso 26/VUS-LB (c.-18G>T) |
| <i>NBN3</i> | Moderado | Indeterminado | - |
| <i>NF1</i> | Moderado | Gastrointestinal, Estromais, Nervos periféricos | - |
| <i>PALB2</i> | Moderado a Alto | Indeterminado | - |
| <i>PTEN</i> | Alto | Tireóide, Renal, Endométrio, Colorretal e Melanoma | - |
| <i>RAD51C</i> | Moderado | - | - |
| <i>RAD51D</i> | Moderado | - | - |
| <i>STK11</i> | Alto | Colorretal | - |
| <i>TP53</i> | Alto | Adrenocortical, Leucemia, Sistema Nervoso, Sarcomas, outros | - |

LP: variante provavelmente patogênica, **P fraca:** fraco poder de patogenicidade, **LB:** variante provavelmente benigna; **VUS:** variante de significado incerto.

Foram também investigados os genes frequentemente alterados em síndromes associadas ao carcinoma colorretal (Quadro 4). Além da variante descrita acima no gene *APC* detectada no caso 4 (falso positiva), dois probandos (casos 20 e 26) apresentaram variantes no gene *MSH6* (VUS), dois casos no gene *MLH1* (casos 17 e 22) e o caso 16 apresentou uma VUS no gene *POLE* (Quadro 4).

Quadro 4 - Variantes P, LP e VUS identificadas em genes associados a síndromes do câncer colorretal hereditário bem estabelecidas em literatura.

| Gene | Síndrome Associada | Penetrância | Pacientes/ variante |
|--|-------------------------------------|-------------|---|
| Genes associados com câncer colorretal | | | |
| <i>MLH1</i> | Síndrome de Lynch | Alta | Caso 17/ (c.VUS-P fraca (c.2027T>C; p.Leu676Pro) Caso 22/LP (c.1852_1853insTTCT; p.Lys618Ilefs*4) Caso 22/VUS-P fraca (c.1853A>T; p.Lys618Met) Caso 22/ VUS-Conflitante (c.2066A>G; p.Gln689Arg) |
| <i>MSH2</i> | Síndrome de Lynch | Alta | - |
| <i>MUTYH</i> | Polipose Associada ao MUTYH | Baixa | Caso 4: LP (c.1187G>A) Caso 14/VUS-P fraca (c.1141G>T; p.Gly381Trp) |
| <i>MSH6</i> | Síndrome de Lynch | Moderada | Caso 20/ VUS-P fraca (c.3974A>T; p.Lys1325Met) Caso 26/VUS-LB (c.-18G>T) |
| <i>MSH3</i> | Polipose Adenomatosa Familiar | Alta | - |
| <i>POLE</i> | Polipose Adenomatosa Familiar | Alta | Caso 16/ VUS-P fraca (c.5C>T; p.Ser2Phe) |
| <i>PMS2</i> | Síndrome de Lynch | Moderada | - |
| <i>NTLH1</i> | Polipose Adenomatosa Familiar | Alta | - |
| <i>EPCAM</i> | Síndrome de Lynch | Moderada | - |
| <i>POLD1</i> | Polipose Adenomatosa Familiar | Alta | - |
| <i>APC</i> | Polipose Adenomatosa Familiar | Alta | Caso 14/ VUS-P fraca (c.2830A>T; p.Asn944Tyr) |
| <i>RNF43</i> | Polipose Adenomatosa Familiar | Moderada | - |
| <i>APC p.11307K</i> | Câncer colorretal | Baixa | - |
| <i>SMAD4</i> | Síndrome de Polipose Juvenil | Alta | - |
| Genes não tradicionalmente associados com câncer colorretal | | | |
| <i>BRCA1</i> | Câncer de mama e ovário hereditário | Alta | Caso 12/VUS-B (c.5348T>C; p.Met1783Thr) Caso 24/VUS-B (c.4843G>A; p.Ala1615Thr) |
| <i>BRCA2</i> | Câncer de mama e ovário hereditário | Alta | - |
| <i>ATM</i> | Câncer de mama, Câncer pancreático | Moderada | Caso 16/VUS-Conflitante (c.6443A>T; p.Lys2148Ile) |
| <i>CHEK2</i> | Câncer de mama | Moderada | - |
| <i>PALB2</i> | Câncer de mama, Câncer pancreático | Moderada | - |
| <i>CDKN2A</i> | Melanoma, Câncer pancreático | Alta | - |

P: variante patogênica, **LP:** variante provavelmente patogênica, **P fraca:** fraco poder de patogenicidade, **B:** variante benigna, **LB:** variante provavelmente benigna; **VUS:** variante de significado incerto.^a variantes detectadas no caso 4 apresentaram baixa cobertura média havendo a necessidade de validar o achado.

Entre os casos estudados, a paciente 24 apresentou uma alteração patogênica no gene *GLB1* (c.818G>T; p.Trp273Leu). A probanda desenvolveu câncer de mama (56a) e CCR (62a), seu pai teve câncer de laringe, sua mãe câncer de pulmão e a avó materna câncer de mama. Variantes no gene da galactosidade beta 1 (*GLB1*) estão associadas GM1-gangliosidose e Síndrome de Morquio B, doenças lisossômicas autossômicas recessivas, portanto, não associadas ao fenótipo em estudo. A paciente 26 (Figura 5) relatou história de inúmeros casos de câncer na família. Esta paciente apresentou uma variante classificada como patogênica (ClinVar) ou VUS/conflitante (ACMG), no gene *KIAA0586* (c.428delG; p.Arg143Lysfs*3). Variantes neste gene foram associadas a Síndrome de Joubert, uma doença de neurodesenvolvimento recessiva; portanto, não relacionada ao fenótipo em estudo. Além disso a probanda também é portadora de uma variante *likely* patogênica no gene *VPS13A* (c.2965-1G>T). Membros da família *VPS13* estão associados com várias doenças humanas. Esse caso também apresentou duas VUS envolvendo o supressor tumoral *ARHGEF12* (o qual codifica uma Rho GTPase com papel fundamental em diferentes processos celulares) e o oncogene *PABPC1*.

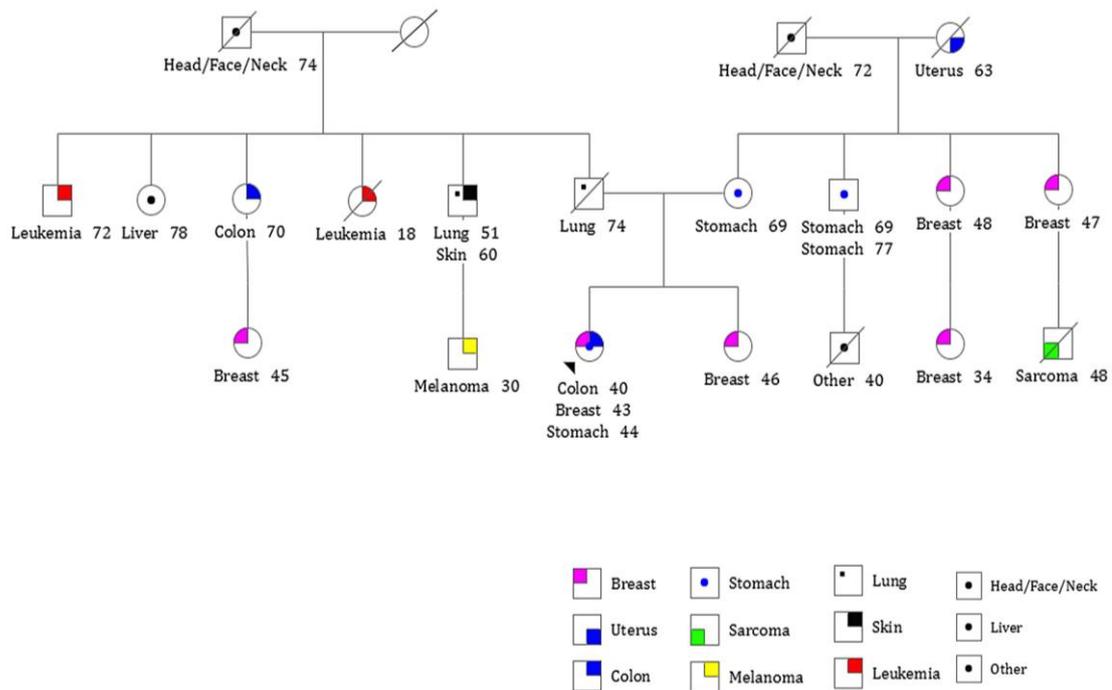


Figura 5 - Heredograma da paciente 26 a qual apresentou três tumores primários e inúmeros casos de câncer na família, incluindo mama e colorretal. A paciente apresentou a variante patogênica no gene *KIAA0586* (c. c.428delG, p.Arg143Lysfs*3) e *likely* patogênica no gene *VPS13A* (c.2965-1G>T).

As 4.830 variantes encontradas e classificadas como VUS foram comparadas com o banco de dados *Catalogue of Somatic Mutations in Cancer-COSMIC* (<https://cancer.sanger.ac.uk/census>), o qual apresenta uma lista de alterações somáticas e germinativas frequentemente relatadas. Este banco de dados é atualizado quando novas evidências são expostas. Estima-se que mais de 1% de todos os genes humanos se apresentam mutados nos cânceres: aproximadamente 90% contêm variantes somáticas, 20% apresentam variantes germinativas e 10% apresentam variantes somáticas e germinativas. Baseando-se em todas essas informações, foi extraída uma tabela desse banco de dados (Census) que contém 723

genes envolvidos em alterações germinativas descritas em cânceres. Estas alterações foram comparadas com aquelas detectadas em nosso estudo classificadas como VUS. Dessa lista, nós identificamos alguns genes contendo as variantes de significado incerto nos pacientes da nossa casuística (Quadro 5). Entre os genes contendo VUS cuja história familiar é concordante com o descrito no COSMIC podemos citar o *MSH6*, *ERCC4*, *MLH1*, *FAT1*, *BRCA1* e *DICER1*. Esses genes são candidatos para serem melhor investigados nas famílias assim como ensaios funcionais, já que foram detectadas variantes de significado incerto.

Quadro 5 - Alterações germinativas descritas em pacientes com câncer segundo o banco de dados COSMIC (<https://cancer.sanger.ac.uk/census>) e que foram detectadas como variantes de significado incerto nos casos avaliados em nosso estudo.

| VUS | COSMIC Gene Census (germinativa) | Casos (variante) | Probando Tipo de tumor | História familiar do câncer relacionado |
|-------|---|---|---|--|
| AR | - | Caso 21 (c.613G>A; p.Gly205Ser) | CM; CCR; melanoma; pulmão | - |
| KDR | Melanoma | Caso 21 (c.475G>A; p.Val159Met) Caso 24 (c.1362T>A; p.His454Gln) Caso 20 (c.406G>A; p.Val136Met) | Caso 20: CM; CCR Caso 21: CM; CCR; melanoma; pulmão Caso 24: CM; CCR | - |
| POLQ | CM | Caso 21 (c.4262_4268delTACTATT; p.Ile1421Argfs*8) | CM; CCR; melanoma; ca pulmão | - |
| POLE | CCR | Caso 16 (c.5C>T; p.Ser2Phe) | CM; ca ovário; CCR | - |
| ATR | Ca de Orofaringe | Caso 20 (c.6394T>G; p.Tyr2132Asp) | CM; CCR | Ca cabeça e pescoço |
| MSH6 | CCR, ca endométrio, ca ovário | Caso 20 (c.3974A>T; p.Lys1325Met) Caso 26 (c.-18G>T) | Caso 20: CM; CCR Caso 26: CM; CCR; ca estômago | Caso 20: CCR Caso 26: CCR |
| TSC2 | Hamartoma, Ca Renal, Esclerose tuberosa | Caso 20 (c.1292C>T; p.Ala431Val) Caso 13 (c.4216G>T; p.Asp1406Tyr) | Caso 13: CM; CCR Caso 20: CM; CCR | Caso 13: - Caso 20: - |
| ALK | Neuroblastoma | Caso 22 (c.2073C>G; p.Ser691Arg) | Caso 22: CM; CCR; ca pulmão; ca fígado | Caso 22: - |
| ERCC4 | Ca de célula basal, Ca de células escamosas, Melanoma | Caso 22 (c.1871G>A; p.Arg624Gln) Caso 18 (c.1979C>T; p.Thr660Ile) Caso 27 (c.1135C>; p.Pro379Ser) | Caso 18: CM; CCR Caso 22: CM; CCR; ca pulmão; ca fígado Caso 27: CM; CCR; ca pâncreas | Caso 18: - Caso 22: Cabeça e pescoço Caso 27:- |
| MLH1 | Carcinoma colorretal, endométrio, Ovário, Sistema Nervoso | Caso 22 (2 alt) (c.1853A>T; p.Lys618Met) (c.2066A>G; p.Gln689Arg) Caso 17 (c.2027T>C; p.Leu676Pro) | Caso 22: CM; CCR; ca pulmão; ca fígado Caso 17: CM; CCR | Caso 22: CCR Caso 17: CCR |
| FAT1 | Ca Pâncreas | Caso 5 (c.2734G>A; p.Val912Ile) Caso 18 (c.883G>A; p.Val295Met) | Caso 5: CM; CCR; ca endométrio Caso 18: CM; CCR | Caso 5- sem história familiar Caso 18: CM |
| PTCH1 | Ca de células basais, Meduloblastoma | Caso 18 (c.1903G>A; p.Asp635Asn) | CM; CCR | - |
| RET | Ca medular de tireóide, ca papilífero da tireóide, Feocromocitoma | Caso 18 (c.2735G>T; p.Arg912Leu) | CM; CCR | - |

Cont/ Quadro 5

| VUS | <i>COSMIC Gene Census</i> (germinativa) | Casos (variante) | Probando Tipo de tumor | História familiar do câncer relacionado |
|---------------|--|--|--------------------------------------|--|
| <i>TERT</i> | Melanoma | Caso 18 (c.1234C>T; p.His412Tyr) | CM; CCR | - |
| <i>BRCA1</i> | CM, Ca de ovário | Caso 12 (c.5348T>C; p.Met1783Thr) Caso 24 (c.4843G>A; p.Ala1615Thr) | Caso 12: CM; CCR Caso 24: CM; CCR | Caso 12: CM Caso 24: CM |
| <i>KIT</i> | *GIST, Epitelioma | Caso 24 (c.1594G>A; p.Val532Ile) | CM; CCR | - |
| <i>XPC</i> | Ca células basal, ca células escamosas, Melanoma | Caso 12 (c.2348C>T; p.Ala783Val) | CM; CCR | - |
| <i>DICER1</i> | Blastoma pleuropulmonar | Caso 25 (c.2378A>G; p.Tyr793Cys) | CM; CCR | Ca pulmão |
| <i>APC</i> | *CCR, ca de Pâncreas, Tumor Desmóide, Hepatoblastoma, Glioma, outros | Caso 14 (c.2830A>T; p.Asn944Tyr) | CM; CCR; Ca renal | Sem história familiar |
| <i>MUTYH</i> | CCR | Caso 14 (c.1141G>T; p.Gly381Trp) | CM; CCR; Ca renal | Sem história familiar |

*CCR: câncer colorretal; CM: câncer de mama; Ca: câncer; *GIST: do inglês, *gastrointestinal stromal tumors*, SNC: sistema nervoso central.

Uma análise adicional foi realizada comparando as VUS detectadas em 43 genes e que se repetiram em mais de um caso com o banco de dados *Cancer Gene Census* (<https://www.sanger.ac.uk/science/data/cancer-gene-census>). A função das proteínas codificadas por estes genes foi também incluída nessa análise (Quadro 6).

Quadro 6 - Genes que apresentaram variantes (VUS) detectadas em mais de um caso entre os 20 pacientes e que foram comparadas com o banco de dados *Cancer Gene Census* (<https://www.sanger.ac.uk/science/data/cancer-gene-census>) e o seu papel no câncer, baseando-se no *PubMed* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>).

| Gene | Casos | Papel no câncer | Função |
|----------------|---------------|-----------------|---|
| <i>USP8</i> | Casos 19 e 20 | oncogene | Codifica uma proteína que pertence à família de proteases processadoras específicas da ubiquitina. |
| <i>ERBB3</i> | Casos 13 e 19 | oncogene | Codifica um membro da família do receptor do factor de crescimento epidérmico (EGFR) das tirosina quinases receptoras. |
| <i>CBLC</i> | Casos 16 e 27 | oncogene, TSG | Codifica um membro da família CBL de ligases de ubiquitina E3. |
| <i>CNTRL</i> | Casos 1 e 26 | fusão | Codifica uma proteína centrossomal necessária para o centrossoma funcionar como um centro organizador de microtúbulos. |
| <i>NSD1</i> | Casos 1 e 26 | fusão | Atua nos sinais de translocação nuclear (NLSs). |
| <i>BCL9</i> | Casos 15 e 26 | oncogene, fusão | Está associado à leucemia linfoblástica aguda das células B. Sua função é desconhecida. |
| <i>PTPRB</i> | Casos 16 e 21 | TSG | Membro da família da proteína tirosina fosfatase (PTP). Sabe-se que as PTPs são moléculas sinalizadoras que regulam uma variedade de processos celulares. |
| <i>CBFA2T3</i> | Casos 5 e 21 | - | Codifica um membro da família do gene de translocação mielóide que interage com os fatores de transcrição ligados ao DNA. |
| <i>BIRC6</i> | Casos 14 e 20 | oncogene, fusão | Codifica uma proteína que atua inibindo a apoptose. |
| <i>MSH6</i> | Casos 20 e 26 | TSG | Reparo a erros de pareamento. |
| <i>MLH1</i> | Casos 17 e 22 | TSG | Reparo a erros de pareamento. |
| <i>FAT3</i> | Casos 14 e 17 | - | Caderina atípica 3, sua função é desconhecida. |
| <i>KMT2C</i> | Casos 5 e 23 | TSG | É um membro da família de leucemia mielóide / linfóide ou de linhagem mista (MLL) e codifica uma proteína nuclear. |
| <i>FGFR4</i> | Caso 5 e 26 | oncogene | Este gene codifica uma tirosina quinase e receptor de superfície celular para fatores de crescimento de fibroblastos. |
| <i>FAT1</i> | Casos 5 e 18 | TSG | O produto gênico possui cinco repetições semelhantes ao fator de crescimento epidérmico (EGF). |

Cont/ Quadro 6

| Gene | Casos | Papel no câncer | Função |
|-----------------|--------------------|----------------------|---|
| <i>RNF213</i> | Casos 18 e 27 | fusão | Está associado à atividade da ATPase. É um gene de suscetibilidade para a doença de Moyamoya (distúrbio vascular das artérias intracranianas). |
| <i>NUP98</i> | Casos 14 e 24 | oncogene, fusão | Regula o transporte de macromoléculas entre o núcleo e o citoplasma. |
| <i>BRCA1</i> | Casos 12 e 24 | TSG | Desempenha um papel na manutenção da estabilidade genômica e como supressor de tumor. |
| <i>BCLAF1</i> | Casos 13 e 24 | - | A expressão aumentada da proteína codificada por esse gene induz a apoptose. |
| <i>CLTCL1</i> | Casos 8, 19 e 24 | TSG, fusão | Codifica uma proteína principal de revestimento de vesículas. |
| <i>ZFH3</i> | Casos 13 e 19 | TSG | Atua no fator de transcrição com múltiplos domínios e regula a diferenciação miogênica e neuronal. |
| <i>TET2</i> | Casos 14 e 16 | TSG | A proteína catalisa a conversão da metilcitosina para 5- hidroximetilcitosina. Variantes foram associadas com doenças mieloproliferativas. |
| <i>KIAA1549</i> | Casos 14, 16, e 27 | fusão | A proteína codificada por esse gene pertence à família <i>UPF0606</i> . Este gene está fundido ao oncogene <i>BRAF</i> em muitos casos de astrocitoma pilocítico. |
| <i>MECOM</i> | Casos 15, 16 e 24 | oncogene, fusão | É um regulador transcricional e oncoproteína que pode estar envolvido na hematopoese, apoptose, desenvolvimento e diferenciação e proliferação celular. |
| <i>RANBP2</i> | Casos 24 e 26 | TSG, fusão | Está associado à membrana nuclear e, acredita-se que controla uma variedade de funções celulares por meio de suas interações com outras proteínas. |
| <i>PPFIBP1</i> | Casos 12 e 26 | fusão | Importante para a orientação axonal e desenvolvimento da glândula mamária. |
| <i>CEP89</i> | Casos 17, 21 e 27 | fusão | Proteína centrossomal, função desconhecida. |
| <i>TCF3</i> | Casos 17, 22 e 25 | oncogene, TSG, fusão | Atua na transcrição ligando-se a sequências reguladoras em genes alvo como heterodímeros ou homodímeros. |
| <i>USP6</i> | Casos 5, 22 e 26 | oncogene, fusão | Proteína específica da ubiquitina. |
| <i>ERCC4</i> | Casos 18, 22 e 27 | TSG | Faz parte de um complexo de reparação do DNA. |
| <i>NUTM2B</i> | Casos 12 e 17 | fusão | Membro da família NUT2B, função desconhecida. |
| <i>NTRK1</i> | Casos 12, 18 e 26 | oncogene TSG, fusão | Diferenciação celular e pode desempenhar um papel na especificação dos subtipos de neurônios sensoriais. |

Cont/ Quadro 6

| Gene | Casos | Papel no câncer | Função |
|----------------|---|----------------------|---|
| <i>PDE4DIP</i> | Caso 13 e 24 | fusão | A proteína codificada por este gene serve para ancorar a fosfodiesterase 4D à região Golgi / centrossoma da célula. |
| <i>RGPD3</i> | Casos 8, 15, 17 e 19 | - | Um dos genes que medeia o silenciamento transcricional de certos genes alvo, associados ao receptor do ácido retinóico e do hormônio da tireoide. |
| <i>NCOR2</i> | Casos 13 e 26 | TSG | Codifica um co-repressor do receptor nuclear que medeia o silenciamento transcricional de certos genes alvo. |
| <i>FAT4</i> | Casos 14, 21, 24 e 27 | TSG | A proteína desempenha um papel na regulação da polaridade celular planar (PCP). |
| <i>KDR</i> | Casos 15, 21 e 24 | oncogene | Este gene codifica um dos dois receptores do <i>VEGF</i> . Este receptor de tirosina-quinase do tipo III funciona como o principal mediador da proliferação endotelial induzida por <i>VEGF</i> . |
| <i>EP300</i> | Casos 12, 13 e 19 | TSG, fusão | Codifica a proteína que regula a transcrição via remodelação da cromatina e é importante nos processos de proliferação e diferenciação celular. |
| <i>CSMD3</i> | Casos 20, 21 e 27 | TSG | Esse gene faz parte da família de proteínas codificadoras. Presença de variantes germinativas em câncer de mama e CCR. |
| <i>CREBBP</i> | Casos 13, 22, 24 e 26 | oncogene, TSG, fusão | A proteína acetila histonas e não histonas. Atua no desenvolvimento embrionário, controle de crescimento e homeostase. Variantes no gene foram associadas a Síndrome de Rubinstein-Taybi. |
| <i>MUC4</i> | Casos 5, 8, 12, 13, 15, 18 e 26 | oncogene | Associado com câncer gástrico. |
| <i>MUC16</i> | Casos 8, 13, 16, 18, 20, 21 e 26 | oncogene | Mucina com potencial papel na formação de uma barreira para proteger as células epiteliais de patógenos. Associadas a pior prognóstico em tumores. |
| <i>PABPC1</i> | Casos 5, 8, 12, 13, 15, 16, 18, 19, 24 e 27 | oncogene, TSG | Gene codifica uma proteína de ligação poli(A), a qual se liga ao mRNA e promove o recrutamento de ribossomos e início tradução. |
| | | | |

*TSG: do inglês, *tumor supressor gene*

Quarenta e três genes se apresentaram variantes de significado incerto em mais de um caso (Quadro 6). Entre eles, o gene *CSMD3* (3 casos), o qual foi descrito como alterado em câncer de mama e colorretal. Variantes no gene *PABPC1* foram detectadas em 10 casos (Quadro 6).

No Quadro 7 estão detalhadas todas as variantes (P, LP, VUS) que estavam presentes em mais de um caso. Nota-se que em vários casos foram detectadas variantes associadas a distintos fenótipos ou doenças não relacionadas com o risco de desenvolvimento do câncer.

Quadro 7 - Genes alterados em mais de um caso considerando as variantes P/LP (patogênicas e provavelmente patogênicas) e VUS (variantes de significado incerto).

| Gene | Variantes Patogênicas e provavelmente patogênicas | Variantes de significado incerto | Genes relacionados (CM/CCR) | Função do gene |
|-----------------|---|----------------------------------|-----------------------------|---|
| <i>ASL</i> | caso 2 [#] | Caso 16 | sim | As variantes nesse gene resultam na acidúria argininosuccínica ou a deficiência de ácido argininosuccínico liase. |
| <i>CEP104</i> | caso 22 | Caso 21 | - | As variantes alélicas desse gene estão associadas à síndrome de Joubert, a qual se caracteriza por malformação do cerebelo e médio-distal, apraxia oculomotora, respiração irregular, atraso no desenvolvimento e ataxia. |
| <i>CP</i> | - | Casos 14 e 17 | - | Codifica uma metaloproteína, variantes no gene estão associadas com aceruloplasminemia |
| <i>DNAH11</i> | caso 15 | Caso 13 | - | ATPase microtubulo-dependente. Variantes associadas com a S. Kartagener |
| <i>DNAJC21</i> | caso 27 | Caso 22 | - | As variantes neste gene resultam na síndrome de falência da medula óssea. |
| <i>DST</i> | caso 8 | Casos 16, 17, 21 e 24 | - | Adesão célula-célula, proliferação celular. |
| <i>KIAA0586</i> | caso 26 | Caso 8 | - | Variantes nesse gene causam a síndrome de Joubert 23. |
| <i>LAMA1</i> | caso 5 | Casos 6, 8 e 26 | - | Adesão celular, diferenciação, migração, sinalização, crescimento de neuritos e metástase. Variantes nesse gene podem estar associadas à síndrome de Poretti-Boltshauser. |
| * <i>MLH1</i> | caso 22 | Casos 17 e 22 | sim | Variantes associadas com o câncer colorretal hereditário. |

Cont/ Quadro 7

| Gene | Variantes Patogênicas e provavelmente patogênicas | Variantes de significado incerto | Genes relacionados (CM/CCR) | Função do gene |
|---------------|---|----------------------------------|-----------------------------|---|
| <i>*MUTYH</i> | caso 4 | Caso 14 | sim | Desempenha um papel na sinalização da apoptose pela introdução de quebras de cadeia simples após danos oxidativos. As variantes nesse gene resultam em predisposição hereditária ao câncer colorretal. |
| <i>PADI3</i> | caso 17 | Caso 24 | - | Juntamente com a enzima tipo I desta família, tem papel de diferenciação terminal da epiderme. |
| <i>RDH12</i> | caso 27 | Caso 22 | - | Defeitos nesse gene estão associados com a amaurose congênita de Leber tipo 13 e Retinite Pigmentosa 53. |
| <i>SGCB</i> | caso 17 | Caso 20 | - | Atua na estabilização das membranas das fibras musculares e ligam o citoesqueleto muscular à matriz extracelular. Variantes nesse gene têm sido associadas à distrofia muscular. |
| <i>SYNE1</i> | caso 8 | Caso 22 | - | Variantes nesse gene foram associadas à ataxia espinocerebelar autossômica recessiva 8, também referida como ataxia cerebelar. |
| <i>TRIOBP</i> | caso 20 | Casos 15 e 22 | - | Está envolvido no desenvolvimento do tecido neural e no controle da organização do citoesqueleto de actina, motilidade celular e crescimento celular. Variantes nesse gene foram associadas a uma forma de surdez não síndrômica autossômica recessiva. |
| <i>VPS13A</i> | caso 26 | Casos 25 e 26 | - | Variantes neste gene causam o distúrbio autossômico recessivo, coréia-acantocitose. |

CM: câncer de mama; CRC: carcinoma colorretal *Genes relacionados com câncer de mama e/ou câncer colorretal. #Alterações que necessitam confirmação devido à qualidade do sequenciamento.

6 DISCUSSÃO

Um significativo número de pacientes com história de câncer em membros da família apresenta variantes germinativas em genes de alta penetrância contribuindo para um risco aumentado de desenvolver neoplasias ao longo da vida. A presença de múltiplos tumores em um único paciente pode estar relacionada a diferentes fatores como o tratamento radioterápico e quimioterápico de um primeiro tumor, fatores ambientais, estilo de vida e a presença de variantes genéticas. Atualmente, é reconhecido que indivíduos jovens com câncer que apresentam múltiplas neoplasias e/ou pacientes com vários familiares acometidos por tumores podem ser portadores de síndromes de predisposição hereditária ao câncer (SPHC) (TUCKER e FRIDMAN 2002; MALKIN 2011; CYBULSKI et al. 2014; UTADA et al. 2014; WHITWORTH et al. 2018). Testes genéticos têm sido realizados para identificar alterações germinativas em genes de predisposição ao câncer nesses indivíduos (TUCKER e FRIDMAN 2002; ALMEIDA e STRATAKIS 2010; WHITWORTH et al. 2018).

O sequenciamento de exoma tem sido de fundamental importância para a identificação de variantes com potencial contribuição para o risco de desenvolvimento de tumores (TUCKER E FRIDMAN 2002; LINDOR et al. 2008; ALMEIDA e STRATAKIS 2010; CYBULSKI et al. 2014; BUERKI et al. 2012; DUMBRAVA et al. 2019; LORCA et al. 2019). O uso desta metodologia no rastreamento de indivíduos portadores de tumores tem sido recomendado nas diretrizes clínicas para o manejo desses tumores (SERRATÌ et al. 2016). No presente estudo foi utilizada a estratégia de sequenciamento do exoma.

Os avanços nas metodologias recentes deram origem a novos desafios devido às dificuldades na interpretação de patogenicidade de variantes e no gerenciamento de grandes conjuntos de dados (NISHIO e USAMI 2017). O *guideline* redigido pela ACMG é constituído por um conjunto de critérios envolvendo quatro principais avaliações: dados populacionais, dados computacionais e preditivos, dados funcionais e análise de co-segregação. Para cada variante é atribuído um código de peso a cada um desses critérios, ao final todos os códigos são combinados e um grau de patogenicidade é atribuído à variante. Podendo essa ser classificada como patogênica, provavelmente patogênica e variantes de significado incerto (<https://www.acmg.net/>). A classificação das variantes LP e VUS pode ser modificada à medida que novos estudos são realizados demonstrando a necessidade de atualização constante. Portanto, é de grande relevância ter conhecimento do período em que tais variantes foram analisadas (em nosso caso em Julho de 2019).

Após a análise detalhada dos dados do sequenciamento foi possível identificar entre os 20 probandos, 4.869 variantes, sendo 11 classificadas como patogênicas (P), 28 provavelmente patogênicas (LP) e 4.830 variantes de significado incerto (VUS). Embora os ensaios de sequenciamento que analisam painéis de genes ou exomas inteiros estão amplamente disponíveis para avaliação de risco de câncer, os métodos para classificação de variantes resultantes desse teste não são bem estudados. MAXWELL et al. (2016) avaliaram a capacidade de uma metodologia de classificação de variantes baseada nas diretrizes ACMG para definir a taxa de variantes e VUS em 180 genes. Os autores sequenciaram o exoma total de 404 indivíduos de 253 famílias e classificaram 1.640 variantes, sendo identificadas as variantes P/LP em 12 dos 25 genes de suscetibilidade ao câncer de mama em 26

famílias sem variantes em *BRCA1* e *BRCA2*. Além disso, 95% dos indivíduos tinham pelo menos uma VUS. Em resumo os autores concluíram que a avaliação de painéis estendidos de genes associados ao câncer em famílias com história de câncer de mama/ovário aumenta substancialmente a complexidade dos resultados e a identificação de VUS (MAXWELL et al. 2016). Quando se obtém o diagnóstico de uma VUS em *BRCA* a tomada de decisão clínica não é bem conhecida. Os autores relataram que os portadores de VUS nos genes *BRCA* com câncer elegeram opções cirúrgicas semelhantes às pacientes com câncer de mama de risco médio. Com o tempo, uma proporção significativa das VUS identificadas em *BRCA1/2* foi reclassificada como P, ilustrando a importância do aconselhamento adequado em relação as variantes classificadas como incertas (WELSH et al. 2017).

Mulheres com câncer de mama ou história familiar deste tumor foram relatadas como tendo um risco duas vezes maior de desenvolver CCR quando comparadas a pacientes sem história familiar deste tipo tumoral (AGARWAL et al. 1986; JANG et al. 2009). Esse risco aumentou quando mais de um parente era diagnosticado com câncer de mama antes dos 50 anos de idade (JANG et al. 2009). Inúmeros fatores contribuem para o aumento da probabilidade de desenvolver câncer de mama ou ovário, mas nenhum fator é tão determinante quanto herdar uma mutação nos genes *BRCA1* ou *BRCA2*. Em um estudo da população da América Latina, foram relatadas variantes fundadoras para estes genes no México (*BRCA1 del exons 9-12*), Brasil (*BRCA1 5382insC e BRCA2 c.156_157insAlu*), Colômbia (*BRCA1 3450del4, A1708E e BRCA2 3034del4*) e nas mulheres latinas residentes no sul da Califórnia (*BRCA1 185delAG, IVS511G.A, S955x,e R1443x*) (OSSA e TORRES 2016). As variantes detectadas em nosso estudo não foram as mesmas

descritas pelos autores. É importante ressaltar que o banco de dados de sequenciamento de exoma da população brasileira (ABraOM – *Brazilian Genomic Variants*), foi utilizado para a comparação com os nossos achados, eliminando assim a possibilidade de inclusão de variantes comuns na nossa população.

Entre os 20 casos analisados, quatro probandos (casos 2, 14, 24 e 27) não preenchem critérios para síndromes de predisposição hereditária ao câncer. Dez pacientes (casos 8, 12, 13, 15, 16, 18, 19, 20, 21 e 25) preenchem critérios para a síndrome do câncer de mama e ovário hereditários (HBOC). Um caso (caso 1) preenche critério para HBOC e Li-Fraumeni (Chompret). Dois casos (4 e 26) preenchem os critérios de HBOC, Síndrome de Li-Fraumeni e de Lynch. Dois casos (17 e 22) se enquadram nos critérios clínicos para HBOC e Síndrome de Lynch. Um caso preenche critério para a Síndrome de Lynch (caso 5). Exceto quatro casos (5, 14, 16 e 21), todos preenchem os critérios de MEIJERS-HEIJBOER et al. (2003) e NASEEM et al. (2006) para a Síndrome do Câncer de Mama e Colorretal Hereditário. Desta forma, aproximadamente 80% dos nossos casos preenchem critérios para as síndromes de predisposição hereditária ao câncer e apenas alguns foram identificados como positivos para variantes classificadas como patogênicas ou provavelmente patogênicas em genes já descritos em SHPC.

A identificação de genes associados ao risco de desenvolvimento do câncer de mama é uma tarefa árdua, como descrito por MEIJERS-HEIJBOER et al. (2003). Os autores relataram 55 famílias com câncer de mama e colorretal onde a variante *CHEK2* 1100delC foi identificada em 18% dos casos. Os autores sugeriram que essa variante não era o principal fator para o desenvolvimento desses tumores, mas

poderia estar em sinergia com outros genes de suscetibilidade ainda não bem conhecidos. Em nossa casuística, não foram detectadas variantes no gene *CHEK2*.

NASEEM et al. (2006), avaliaram a associação entre o câncer de mama e câncer colorretal em um período de 16 anos (1990-2005). A análise de alterações germinativas em 113 indivíduos revelou um caso positivo para a variante *CHEK2* 1100delC, 14 (17%) famílias segregavam variantes para *BRCA1* e *BRCA2*, e sete famílias (8,5%) eram portadoras de variantes nos genes *MLH1* e *MSH2*. Os autores de ambos os estudos (MEIJERS-HEIJBOER et al. 2003; NASEEM et al. 2006) reforçam que muitas famílias apresentam variantes em genes de alta penetrância existentes que podem explicar o fenótipo. Entretanto, mais estudos seriam necessários para entender os demais casos, onde a maioria preenche o critério clínico para as síndromes de predisposição hereditária, mas se apresentam negativos para genes já descritos no envolvimento de tumores.

Dois probandos (casos 12 e 24) apresentaram diferentes VUS no gene *BRCA1*. A probanda 12 (c.5348T>C; p.Met1783Thr) apresentou o CCR (52 anos) e tumor de mama bilateral (73 e 77 anos na mama esquerda e direita, respectivamente) e um histórico familiar de câncer de próstata, ovário, fígado e mama (sendo esse último o tumor prevalente na família). A paciente 12 preenchia os critérios clínicos da síndrome do câncer de mama e ovário hereditário enquanto a paciente 24, também com uma VUS no gene *BRCA1*, não preenchia critérios clínicos para síndromes hereditárias de predisposição ao câncer.

O caso 16 apresentou uma VUS no gene *ATM* (c.6443 A>T). O gene *ATM* é descrito como tendo penetrância incompleta no risco de desenvolvimento do câncer de mama. Variantes germinativas no gene *ATM* também foram relatadas em

pacientes com CRC (PEARLMAN et al. 2017). Recentemente, ANDRÉS et al. (2019) descreveram uma alteração patogênica no gene *ATM* (c.2413C> T; p.Arg805X) em uma paciente com múltiplos tumores primários. Estima-se que aproximadamente 2% da população geral apresente uma variante heterozigota em *ATM* e portadores destas variantes tem um risco aumentado para desenvolver câncer de mama e, potencialmente, câncer de pâncreas (JERZAK et al. 2018). O gene *ATM* foi identificado em um caso de toda a nossa casuística, sendo uma mutação classificada como incerta até o momento (caso 16). A variante detectada no caso 16 pode explicar o desenvolvimento de câncer de mama e colorretal nesta paciente.

Quatro casos (2, 14, 24 e 27) não preenchem critérios para as síndromes hereditárias. O caso 2 apresentou uma única variante classificada como patogênica pelo ClinVar e VUS/Conflitante pelo ACMG no gene *ASL* (c.35G>A; p.Arg12Gln). Variantes no gene *ASL* resultam no distúrbio autossômico recessivo acidúria argininosuccínica ou na deficiência do ácido argininosuccínico (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/435>). Portanto este gene não teria contribuição para o fenótipo de uma síndrome de câncer hereditária.

O caso 14 que também não se enquadrou em nenhum critério clínico de síndrome de predisposição ao câncer hereditário. Este probando apresentou uma VUS no gene *MUTYH* (c.1141G>T; p.Gly381Trp) e outra no gene *APC* (c.2830A>T; p.Asn944Tyr). O gene *APC* faz parte do grupo de supressores tumorais que atuam na via de sinalização, migração, adesão celular, ativação transcricional e apoptose. Variantes nesse gene causam polipose adenomatosa familiar (FAP), uma doença autossômica dominante que geralmente progride para malignidade (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/324>). O probando apresentou o

desenvolvimento de tumor renal, câncer de mama e CCR, e não apresentou histórico de cânceres na família, até o momento. Recentemente, TERLOUW et al. (2019) analisaram os registros médicos de 2082 pacientes no período de 1992-2017 e relataram que a prevalência de variantes no gene *APC* aumentavam significativamente com o número de adenomas, enquanto a MAP (polipose associada ao *MUTYH*) mostrava um pico de prevalência em indivíduos com 50 a 99 adenomas (TERLOUW et al. 2019). As VUS nos genes *APC* e *MUTYH* neste paciente poderiam explicar o seu fenótipo, entretanto, outros estudos são necessários para confirmar estes achados.

O caso 24 apresentou uma VUS no gene *BRCA1* (p.Ala1615Thr) tendo um tumor de mama (55 anos) e CCR (62 anos) e história de câncer de laringe, pulmão e mama em sua família. Essa variante poderia explicar o fenótipo nesse probando e a história de câncer na família. Estas variantes precisariam ser investigadas nos membros da família sendo também necessários estudos funcionais para confirmar o potencial patogênico da variante. Já o caso 27 apresentou CCR (59a), Ca de mama (64a), Ca pâncreas (86a) e histórico familiar: mãe (Ca útero 60a), irmão (CCR 50a). A probanda não preenche critérios para síndromes hereditárias conhecidas, e foi diagnosticada com variantes classificadas como patogênicas e provavelmente patogênicas nos genes *DDX11* (esse gene é um homólogo do gene *CHL1* da levedura e pode funcionar para manter a fidelidade da transmissão cromossômica e a estabilidade do genoma), *DNAJC21* (variantes neste gene resultam na síndrome de falência da medula óssea) e *RDH12* (defeitos nesse gene estão associados com a amaurose congênita de Leber tipo 13 e Retinite Pigmentosa 53). Até o momento não encontramos estudos que associam esses genes com o desenvolvimento de tumores.

O desenvolvimento de tumores primários em áreas submetidas à radioterapia para tratamento de um primeiro tumor já foi relatado em vários estudos e é mais prevalente em crianças e adultos jovens (NEGLIA et al. 2006b; KLEINERMAN 2009; MEADOWS et al. 2009; HARBRON et al. 2013). Entre os pacientes do nosso estudo que foram tratados com radioterapia para o primeiro tumor, seis casos (2, 13, 15, 19, 24 e 27) não apresentaram o segundo tumor em área próxima à radiação, curiosamente entre eles, cinco desenvolveram câncer de mama como primeiro e câncer colorretal como o segundo tumor primário, somente um paciente apresentou o oposto. HISADA et al. (1998) relataram que o risco relativo de um segundo tumor primário após radioterapia é de 5,3%, com uma probabilidade acumulada de 57% até 30 anos após o diagnóstico da primeira neoplasia. Nesse estudo, alguns segundos tumores primários foram possivelmente radio-induzidos. Em um estudo que avaliou o desenvolvimento de neoplasias hematológicas após o tratamento do câncer de mama de acordo com o tratamento pós-operatório inicial demonstrou que, do total de 324.056 sobreviventes do CM, 15,5% foram submetidos apenas à cirurgia, 46,7% receberam radioterapia após a cirurgia, 4,3% receberam quimioterapia após a cirurgia e 33,5% receberam as três modalidades (JABAGI et al. 2019). No total, foram observados 2236 casos de neoplasias hematológicas e um dos resultados observados é que quando comparado ao grupo isolado da cirurgia no tratamento primário, a leucemia mielóide aguda aumentou significativamente após a cirurgia mais radiação. O benefício adicional da quimioterapia e radioterapia deve levar em consideração essas complicações ao longo prazo nos pacientes tratados (JABAGI et al. 2019). Em adição, pacientes portadores de variantes de risco poderiam ter um aumento ainda maior para desenvolver de neoplasias secundárias.

Cinco pacientes do nosso estudo desenvolveram câncer de mama bilateral (casos 12, 13, 18, 20 e 21). Entretanto, apenas uma paciente (caso 13) foi tratada por radioterapia do primeiro câncer de mama (informações não disponíveis para o caso 20, tratada em outro serviço). Segundo HARBRON et al. (2013) investigaram a ocorrência de neoplasia maligna secundária após radioterapia (TR) para câncer em crianças e adultos jovens, após um período médio de acompanhamento de sete anos. Os pacientes tratados com radioterapia tiveram um risco quase cinco vezes maior de desenvolver uma neoplasia primária subsequente do que a população em geral na faixa etária de 0 a 29 anos. O tipo mais comum de segundo tumor primário associado à radioterapia foi do sistema nervoso central (28%), seguido por sarcoma (25%) e leucemia (19%) (HARBRON et al. 2013).

Nós verificamos que o câncer de mama foi o primeiro tumor primário mais frequente entre os 20 casos do nosso estudo. JANG et al. (2009) descreveram que mulheres com história familiar de câncer de mama possuem um risco aumentado de desenvolver CCR e que esse risco aumentava quando mais de um parente era diagnosticado com CM antes dos 50 anos de idade. Dois dos nossos casos (casos 12 e 26) relataram mais de um familiar com tumor de mama antes dos 50 anos, porém não foi possível obter essas informações para alguns familiares devido à impossibilidade de comunicação.

DA SILVA et al. (2010) descreveram pacientes diagnosticados com câncer colorretal e que preenchem os critérios de Amsterdam I ou II, apresentam o câncer de mama como o tumor extracolônico mais frequente entre as mulheres (32/123 casos seguido de outros 12 tipos tumorais). Subsequentemente, BUERKI et al. (2012), relataram que o câncer de mama foi o segundo tumor extracolônico de maior

frequência entre os pacientes portadores de Síndrome de Lynch (11,8%). Os autores também relataram que a incidência da doença era maior em pacientes positivos para mutações no gene *MSH2* (10,1%) e menor nos *MLH1* positivos (2,7%). O diagnóstico conclusivo de síndrome de Lynch é definido pela presença de mutação em um dos genes de reparo a erros de pareamento (do inglês, *mismatch repair* - MMR), principalmente nos genes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* e *PMS2*. Nós identificamos cinco casos (4, 5, 17, 22 e 26) que preenchiam os critérios clínicos para a SL, isoladamente ou combinado com outras síndromes. Como já discutido anteriormente, o caso 4 apresentou uma VUS provavelmente patogênica no gene *MUTYH* confirmada por sequenciamento de Sanger. Os casos 17 e o 22 apresentaram variantes no gene *MLH1*, e o caso 26 apresentou uma VUS no gene *MSH6* (c.-18G>T), descritos em detalhes a seguir.

O caso 16 apresentou uma VUS no gene *POLE* (c.5C>T; p.Ser2Phe). Esse gene é considerado de risco para a Polipose Adenomatosa Familiar (FAP), uma doença autossômica dominante que geralmente progride para malignidade (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/324>). Este gene codifica uma subunidade catalítica da polimerase ϵ que atua no reparo do DNA e replicação dos cromossomos (Palles et al., 2013). Variantes patogênicas ou LP no domínio da exonuclease do gene *POLE* foram preconizadas como úteis na indicação de colonoscopia e manejo clínico de pacientes com câncer colorretal (BUCHANAN et al., 2018)). Entretanto, a variante descrita em nosso estudo não está localizada neste domínio.

A probanda 17 desenvolveu CCR (43 anos), câncer de mama bilateral (48 e 54 anos) e tem histórico familiar destes tumores: filha (CCR), irmã (CCR), mãe (Ca mama) e tio paterno (CCR). A paciente apresentou uma VUS no gene *MLH1*

(c.2027T>C; p.Leu676Pro). Como descrito anteriormente esse gene está associado à Síndrome de Lynch e a presença desta variante poderia explicar o fenótipo.

Foram investigadas variantes associadas com câncer colorretal entre os 20 casos aqui avaliados. O caso índice 22 apresentou uma variante provavelmente patogênica no gene *MLH1* (c.1852_1853insTTCT; p.Lys618Ilefs*4). A paciente tinha história de câncer de mama (43 anos) e CCR (47 anos) e história familiar de câncer de duodeno (avô materno), câncer de tireoide e nódulos mamários (tia materna) e o irmão apresentou adenoma colorretal. A proteína codificada pelo gene *MLH1* está envolvida na sinalização de danos ao DNA, e o gene frequentemente mutado no câncer de cólon hereditário sem polipose (HNPCC). As variantes que ocorrem no *MLH1* e *MSH2* são responsáveis por 90% das variantes detectadas no HNPCC (FULLERTON et al. 2004). A variante detectada no gene *MLH1* no paciente 22 poderia explicar a história familiar. Entretanto, é de grande relevância avaliar esta variante em outros membros da família assim como confirmar o seu papel quanto a sua patogenicidade.

Dois probandos apresentaram VUS no gene *MSH6*, o caso 20 (c.3974A>T; p.Lys1325Met) e o caso 26 (c.-18G>T). O probando 20 tem critérios clínicos para HBOC e o probando 26 preenche os critérios da Síndrome de Lynch. Em um recente estudo, ROBERTS et al. (2018) relataram um modesto, mas significativo risco para o desenvolvimento de câncer de mama em pacientes portadores de variantes nos genes *MSH6* e *PMS2*. Anteriormente, HEGDE et al. (2014) relataram que *MSH6* e *PMS2* são responsáveis por aproximadamente 7-10% e <5%, respectivamente, das famílias com Síndrome de Lynch. Não foram detectadas variantes no gene *PMS2* entre os

casos aqui estudados e as variantes no gene *MSH6* poderiam explicar o fenótipo aqui estudado.

Foram identificadas variantes patogênicas nos casos: *SGCB* (caso 17) e *GLB1* (caso 24). As variantes LP foram detectadas nos genes *MUTYH* (caso 4), *LAMA1* (caso 5), *DST*, *IMPAD1* e *SYNE1* (caso 8), *SLC3A1*, *DNAH11*, *MFF* e *SLC26A4* (caso 13), *TRNT1* (caso 16), *CYP1B1* (caso 18), *TRIOBP* (caso 20), *SPATA5* (caso 21), *CEP104*, *CRYAA* e *MLH1* (caso 22), *CSPP1* (caso 24), *DDX11* e *DNAJC21* (caso 27). Como já apresentamos alguns desses genes (como *MUTYH* e *MLH1*) já são bem descritos em literatura no envolvimento de CCR, porém a maior parte desses genes não foi associado a síndromes hereditárias. Os nossos resultados podem abrir novos caminhos para futuras investigações nestas variantes contribuindo para identificação de risco de desenvolvimento da doença.

Em dois casos do nosso estudo, não foram obtidas coberturas suficientes para resultados confiáveis (casos 1 a 4). A paciente 4 tinha história de múltiplos tumores primários incluindo carcinoma de retosigmoide (38 anos) e pólipos sésseis, carcinoma de mama (40 anos), carcinoma de endométrio e shwanoma de pele. O seu tumor de reto foi avaliado como positivo para as proteínas de reparo MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2, sendo, portanto, proficiente para as proteínas MMR. Além disso, essa paciente também foi testada para variantes nos genes *TP53*, *BRCA1* e *BRCA2* sendo negativa para variantes patogênicas (sequenciamento de Sanger). A paciente 4 apresentou uma variante LP (c.1187G>A; confirmada por sequenciamento de Sanger) e outra VUS no gene *MUTYH*. O gene *MUTYH* está envolvido no reparo a danos oxidativos no DNA, com um papel na sinalização da apoptose pela introdução de quebras de fita simples após dano oxidativo. As variantes nesse gene resultam em

predisposição hereditária ao câncer colorretal, denominada polipose associada ao MUTYH (MAP) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4595>). SCARPITTA et al. (2019) identificaram variantes germinativas em 22 de 81 pacientes com câncer de mama masculino (23%) nos genes *BRCA2*, *BRIP1*, *MUTYH* e *PMS2*. Estes achados deram evidências que o *MUTYH* além de ser característico no CCR hereditário também é encontrado em pacientes com câncer de mama. É possível que o fenótipo do paciente 4 esteja associado a presença das variantes no gene *MUTYH* que contribuiria para o risco de desenvolvimento do câncer de mama e colorretal.

O caso 26 relatou história de inúmeros parentes acometidos por câncer. Esta paciente apresentou uma variante patogênica no gene *KIAA0586* (c.428delG; p.Arg143Lysfs*3) e uma LP no gene *VPS13A* (c.2965-1G>T), as quais não estão associadas ao fenótipo em estudo. MUÑOZ-BRACERAS et al. (2019) avaliaram a interação entre os homólogos humanos *VPS13A* e *RAB7A*, e relataram que *VPS13A* está localizado nas mitocôndrias, sugerindo seu papel na comunicação entre organelas. Esse caso também apresentou duas VUS envolvendo o supressor tumoral *ARHGEF12* (o qual codifica uma Rho GTPase com papel fundamental em diferentes processos celulares) e o oncogene *PABPC*. Novos estudos são necessários para avaliar o papel do gene supressor tumoral *ARHGEF12* na predisposição hereditária ao câncer.

Nós identificamos variantes no gene *CSMD3* em três dos 20 casos investigados. Embora pouco explorado em literatura, há estudos que relatam o seu envolvimento em câncer de mama e colorretal. Em um estudo sistemático de sequenciamento de genes codificadores de proteínas GYLFE et al. (2010) identificaram 280 genes candidatos ao risco de desenvolvimento do câncer de mama

e colorretal. Os autores analisaram 45 pacientes com história familiar de CCR e que não apresentavam mutações em genes conhecidos de predisposição ao câncer. Os autores rastrearam variantes somáticas e 15 genes na linhagem germinativa e identificaram 22 variantes somáticas não sinônimas, das quais a maioria era do tipo *missense*. Na linhagem germinativa, descreveram três novas variantes não sinônimas nos genes *CSMD3*, *EPHB6* e *C10orf137*. Em um estudo mais recente, LAÉ et al. (2016), relataram amplificação do gene *CSMD3* em 53 CM. Esse gene é um potencial candidato de risco para o desenvolvimento destes tumores.

Variantes no oncogene *PABPC1* foram detectadas em dez pacientes do nosso estudo (casos 5, 8, 12, 13, 15, 16, 18, 19, 24 e 27). Esse gene codifica uma proteína de ligação poli(A), a qual se liga ao mRNA e promove o recrutamento de ribossomos e início tradução. A expressão aumentada de *PABPC1* promove progressão e metástase em vários tipos tumorais (WANG Q et al., 2020). Em câncer de mama, *PABPC1* é indispensável o início da tradução por meio da interação com EIF4G1, uma proteína necessária para a formação de êmbolos nestes tumores (SILVERA et al., 2009).

Em conjunto, os dados obtidos neste estudo apontam para genes candidatos ao risco de desenvolvimento de cânceres de mama e colorretal em famílias, os quais poderiam explicar a história pessoal e familiar destes tumores. Foram também identificadas variantes em genes de reparo a erros de pareamento, entre outros previamente associados com o risco de desenvolvimento destes tumores. Uma variedade de VUS foi compartilhada entre esses probandos sugerindo que pelo menos uma parcela dos casos poderia ser explicada por uma herança poligênica.

Novos estudos são necessários para confirmar o papel dessas variantes assim como a investigação de variantes específicas entre os familiares dos pacientes em análise.

7 CONCLUSÕES

- Foram identificadas 11 variantes classificadas como patogênicas, 28 provavelmente patogênicas e 4830 variantes de significado incerto entre os 20 probandos deste estudo.
- Todos os casos apresentaram variantes de significado incerto.
- Três casos (1, 2 e 4) apresentaram baixa qualidade de sequenciamento e deverão ser re-sequenciados. Entretanto, o caso 4 foi analisado utilizando outras estratégias para confirmar algumas variantes.
- O caso 4, apresentou por SET uma variante patogênica no *APC* (c.465delA; p.Asp156Thrfs*14) e uma LP no gene *MUTYH* (c.1187G>A; p.Gly396Asp). A segunda variante foi confirmada sequenciamento de Sanger enquanto a variante no gene *APC* era falso positiva. A síndrome da polipose associada ao *MUTYH* poderia explicar o fenótipo do paciente 4. A análise de outros membros desta família é essencial para explicar o fenótipo.
- Seis de 20 casos (30%) apresentaram variantes em genes de reparo a erros de pareamento, as quais poderiam explicar a presença destes tumores nos pacientes e em seus parentes. Entre elas, foi detectada a variante LP do gene *MLH1* (c.1852_1853insTTCT; p.Lys618Ilefs*4) no caso 22. Foram detectadas VUS em dois probandos (casos 20 e 26) no gene *MSH6*, dois casos no gene *MLH1* (casos 17 e 22) e um no gene *POLE* (caso 16). Como a maioria das variantes detectadas são de significado incerto, são necessários estudos funcionais e de membros das famílias para confirmar se o fenótipo destas famílias é explicado pela presença destas variantes.

- O caso 14 não se enquadrou em nenhum critério clínico de síndrome de predisposição ao câncer hereditário mas apresentou uma VUS no gene *MUTYH* (c.1141G>T) e outra no gene *APC* (c.2830A>T), as quais poderiam contribuir para o fenótipo.
- Foram também pesquisados os principais genes associados com a síndrome de câncer de mama hereditário. Dois probandos (casos 12 e 24) apresentaram VUS no gene *BRCA1* e um no gene *ATM* (caso 16). Interessantemente, o caso 16 apresentou VUS nos genes *POLE* e *ATM*.
- A paciente 26 apresentou uma VUS no supressor tumoral *ARHGEF12* (o qual codifica uma Rho GTPase com papel fundamental em diferentes processos celulares).
- Baseado nos achados do grande número variantes detectados neste grupo de pacientes, não podemos descartar a possibilidade que mais de um gene (herança poligênica) além dos aqui detalhados possam explicar o fenótipo de alguns desses pacientes.
- É possível que alterações no número de cópias ou rearranjos estruturais estejam envolvidos no risco de desenvolvimento destes tumores, as quais não foram investigadas usando a estratégia deste estudo.
- Como a maioria das variantes detectadas em genes previamente descritos como associados ao risco de câncer de mama e colorretal é de significado incerto, são necessários estudos funcionais e de membros das famílias para confirmar o seu significado.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

Alkner S, Ehinger A, Bendahl PO, Rydén L, Fernö M. Prognosis, stage and oestrogen receptor status of contralateral breast cancer in relation to characteristics of the first tumour, prior endocrine treatment and radiotherapy. **Eur J Cancer** 2015; 51:2304-13.

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

Andrés R, Menao S, Arruebo M, Quílez E, Cardiel MJ. Double heterozygous mutation in the BRCA1 and ATM genes involved in development of primary metachronous tumours: a case report. **Breast Cancer Res Treat** 2019; 177:767-70.

Becker KG, Barnes KC, Bright TJ, Wang SA. The genetic association database. **Nat Genet** 2004; 36:431-2.

Broman KK, Bailey CE, Parikh AA. Sidedness of colorectal cancer impacts risk of second primary gastrointestinal malignancy. **Ann Surg Oncol** 2019; 26:2037-43.

Buchanan DD, Stewart JR, Clendenning M, Rosty C, Mahmood K, Pope BJ, Jenkins MA, Hopper JL, Southey MC, Macrae FA, Winship IM, Win AK. Correction: Risk of colorectal cancer for carriers of a germ-line mutation in POLE or POLD1. **Genet Med**. 2018; 20(10):1299.

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

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

Choi M, Scholl UI, Ji W, et al. Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2009; 106:19096-101.

Cingolani P, Platts A, Wang Le L, et al. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3. **Fly** 2012; 6:80-92.

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

Cybulski C, Nazarali S, Narod SA. Multiple primary cancers as a guide to heritability. **Int J Cancer** 2014; 135:1756-63.

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

Depristo MA, Banks E, Poplin R, et al. A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. **Nat Genet** 2011; 43:491-8.

Desvillechabrol D, Bouchier C, Kennedy S, Cokelaer T. Sequana coverage: detection and characterization of genomic variations using running median and mixture models. **Gigascience** 2018; 7:giy110.

Dumbrava EI, Brusco L, Daniels M, et al. Expanded analysis of secondary germline findiSET from matched tumor/normal sequencing identifies additional clinically significant mutations. **JCO Precis Oncol** 2019; 3.

Duzkale H, Shen J, McLaughlin H, et al. A systematic approach to assessing the clinical significance of genetic variants. **Clin Genet** 2013; 84:453-63.

Fayaz S, Demian GA, Eissa HE, Abuzalouf S. Second primary tumors associated with breast cancer: Kuwait cancer control center experience. **Gulf J Oncolog** 2017; 1:35-40.

Fullerton DA, López F, Avendaño R, Aparicio R, Wistuba I. [Atypical presentation of a colorectal carcinoma]. **Rev Med Chil** 2004; 132:985-8.

Goldgar DE, Easton DF, Cannon-Albright LA, Skolnick MH. Systematic population-based assessment of cancer risk in first-degree relatives of cancer probands. **J Natl Cancer Inst** 1994; 86:1600-8.

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

Gylfe AE, Sirkiä J, Ahlsten M, Järvinen H, Mecklin JP, Karhu A, Aaltonen LA. Somatic mutations and germline sequence variants in patients with familial colorectal cancer. **Int J Cancer**. 2010; 2974-80.

Harbron RW, Feltbower RG, Glaser A, Lilley J, Pearce MS. Secondary malignant neoplasms following radiotherapy for primary cancer in children and young adults. **Pediatr Hematol Oncol** 2013; 31:259-67.

Hegde M, Ferber M, Mao R, et al. ACMG technical standards and guidelines for genetic testing for inherited colorectal cancer (Lynch syndrome, familial adenomatous polyposis, and MYH-associated polyposis). **Genet Med** 2014; 16:101-16.

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

[IARC] International Agency for Research on Cancer. **Subject on morbidity, mortality, and colorectal cancer data**. Available from: <URL:www.iarc.fr> [2019 set 12]

Jabagi MJ, Goncalves A, Vey N, Le Tri T, Zureik M, Dray-Spira R. Risk of hematologic malignant neoplasms after postoperative treatment of breast cancer. **Cancers** 2019; 11:1463.

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

Jerzak KJ, Mancuso T, Eisen A. Ataxia-telangiectasia gene (ATM) mutation heterozygosity in breast cancer: a narrative review. **Curr Oncol** 2018; 25:e176-e80.

Kast K, Rhiem K, Wappenschmidt B, et al. Prevalence of BRCA1/2 germline mutations in 21 401 families with breast and ovarian cancer. **J Med Genet** 2016; 53:465-71.

Keating NL, Stoeckert KA, Regan MM, DiGianni L, Garber JE. Physicians' experiences with BRCA1/2 testing in community settings. **J Clin Oncol** 2008; 26:5789-96.

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

LaDuca H, Stuenkel AJ, Dolinsky JS, et al. Utilization of multigene panels in hereditary cancer predisposition testing: analysis of more than 2,000 patients. **Genet Med** 2014; 16:830-7.

Laé M, La Rosa P, Mandel J, Reyal F, Hupé P, Terrier P, Couturier J. Whole-genome profiling helps to classify phyllodes tumours of the breast. **J Clin Pathol**. 2016; 1081-1087.

Lek M, Karczewski KJ, Minikel EV, et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. **Nature** 2016; 536:285-91.

Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. **Bioinformatics** 2009; 25:1754-60.

Lindor NM, Master ML, Lindor CJ, et al. National Cancer Institute, Division of Cancer Prevention, Community Oncology and Prevention Trials Research Group. Concise hand book of familial cancer susceptibility syndromes – second edition. **J Natl Cancer Inst Monogr** 2008; 38:1-93.

Lorca V, Rueda D, Martín-Morales L, et al. Contribution of new adenomatous polyposis predisposition genes in an unexplained attenuated Spanish cohort by multigene panel testing. **Sci Rep** 2019; 9:9814.

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

Maxwell KN, Hart SN, Vijai J, et al. Evaluation of ACMG-guideline-based variant classification of cancer susceptibility and non-cancer-associated genes in families affected by breast cancer. **Am J Hum Genet** 2016; 98:801-17.

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

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

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

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

Miller KD, Siegel RL, Lin CC, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2016. **CA Cancer J Clin** 2016; 66:271-89.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro; INCA: 2019.

Monsalve J, Kapur J, Malkin D, Babyn PS. Imaging of cancer predisposition syndromes in children. **Radiographics** 2011; 31:263-80.

Morton LM, Sampson JN, Armstrong GT, et al. Genome-wide association study to identify susceptibility loci that modify radiation-related risk for breast cancer after childhood cancer. **J Natl Cancer Inst** 2017; 109:djx058.

Muñoz-Braceras S, Tornero-Écija AR, Vincent O, Escalante R. VPS13A is closely associated with mitochondria and is required for efficient lysosomal degradation. **Dis Model Mech** 2019; 12:036681

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

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

Neglia R, Colombari B, Peppoloni S, et al. Adaptive response of microglial cells to in vitro infection by *Candida albicans* isolates with different genomic backgrounds. **Microb Pathog** 2006b; 41:251-6.

Ngeow J, Sesock K, Eng C. Breast cancer risk and clinical implications for germline PTEN mutation carriers. **Breast Cancer Res Treat** 2017; 165:1-8.

Nishio SY, Usami SI. The Clinical Next-Generation Sequencing Database: a tool for the unified management of clinical information and genetic variants to accelerate variant pathogenicity classification. **Hum Mut** 2017; 38:252-9.

[OMS] Organização Mundial da Saúde. **Estimativas dos cânceres na população**. Available from: <URL:<http://www.saude.gov.br/oms>> [2019 ago 12]

Ossa CA, Torres D. Founder and recurrent mutations in BRCA1 and BRCA2 genes in Latin American Countries: state of the art and literature review. **Oncologist** 2016; 21:832-9.

Palles C, Cazier JB, Howarth KM, Domingo E, Jones AM, Broderick P, Kemp Z, et al. Germline mutations affecting the proofreading domains of POLE and POLD1 predispose to colorectal adenomas and carcinomas. **Nat Genet** 2013; 136-44.

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

Pilié PG, Johnson AM, Hanson KL, et al. Germline genetic variants in men with prostate cancer and one or more additional cancers. **Cancer** 2017; 123:3925-32.

Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. **Genet Med** 2015; 17:405-24.

Roberts ME, Jackson SA, Susswein LR, et al. MSH6 and PMS2 germ-line pathogenic variants implicated in Lynch syndrome are associated with breast cancer. **Genet Med** 2018; 20:1167-74.

Rodríguez-Escudero I, Oliver MD, Andrés-Pons A, Molina M, Cid VJ, Pulido R. A comprehensive functional analysis of PTEN mutations: implications in tumor- and autism-related syndromes. **Hum Mol Genet** 2011; 20:4132-42.

Scarpitta R, Zanna I, Aretini P, et al. Germline investigation in male breast cancer of DNA repair genes by next-generation sequencing. **Breast Cancer Res Treat** 2019 Sep. 11. [Epub ahead of print]

Serrati S, De Summa S, Pilato B, Petriella D, Lacalamita R, Tommasi S, Pinto R. Next-generation sequencing: advances and applications in cancer diagnosis. **Onco Targets Ther** 2016; 9:7355-65.

Shields AE, Burke W, Levy DE. Differential use of available genetic tests among primary care physicians in the United States: results of a national survey. **Genet Med** 2008; 10:404-14.

Silvera D, Arju R, Darvishian F, Levine PH, Zolfaghari L, Goldberg J, Hochman T, Formenti SC, Schneider RJ. Essential role for eIF4GI overexpression in the pathogenesis of inflammatory breast cancer. **Nat Cell Biol.** 2009; 11(7):903-8.

Silverman BG, Lipshitz I, Keinan-Boker L. Second primary cancers after primary breast cancer diagnosis in Israeli women, 1992 to 2006. **J Glob Oncol** 2016; 3:135-42.

Solomon I, Harrington E, Hooker G, et al. Lynch Syndrome Limbo: patient understanding of variants of uncertain significance. **J Genet Couns** 2017; 26:866-77.

Terlouw D, Suerink M, Singh SS, et al. Declining detection rates for APC and biallelic MUTYH variants in polyposis patients, implications for DNA testing policy. **Eur J Hum Genet** 2019 Sep 16. [Epub ahead of print]

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

Turner SA, Rao SK, Morgan RH, Vnencak-Jones CL, Wiesner GL. The impact of variant classification on the clinical management of hereditary cancer syndromes. **Genet Med** 2019; 21:426-30.

Utada M, Ohno Y, Hori M, Soda M. Incidence of multiple primary cancers and interval between first and second primary cancers. **Cancer Sci** 2014; 105:890-6.

Villacis RA, Basso TR, Canto LM, Nóbrega AF, Achatz MI, Rogatto SR. Germline large genomic alterations on 7q in patients with multiple primary cancers. **Sci Rep** 2017a; 7:41677.

Villacis RAR, Basso TR, Canto LM, et al. Rare germline alterations in cancer-related genes associated with the risk of multiple primary tumors development. **J Mol Med (Berl)** 2017b; 95:523-33.

Vos J, Otten W, van Asperen C, Jansen A, Menko F, Tibben A. The counselees' view of an unclassified variant in BRCA1/2: recall, interpretation, and impact on life. **Psychooncology** 2008; 17:822-30.

Wang K, Li M, Hakonarson H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. **Nucleic Acids Res** 2010; 38:e164.

Wang Q, Wang Z, Bao Z, Zhang C, Wang Z, Jiang T. PABPC1 relevant bioinformatics profiling and prognostic value in gliomas. **Future Oncol.** 2020; 16(1):4279-4288.

Weir HK, Johnson CJ, Ward KC, Coleman MP. The effect of multiple primary rules on cancer incidence rates and trends. **Cancer Causes Control** 2016; 27:377-90.

Welsh JL, Hoskin TL, Day CN, et al. Clinical decision-making in patients with variant of uncertain significance in BRCA1 or BRCA2 Genes. **Ann Surg Oncol** 2017; 24:3067-72.

Whitworth J, Smith PS, Martin JE, et al. Comprehensive cancer-predisposition gene testing in an adult multiple primary tumor series shows a broad range of deleterious variants and atypical tumor phenotypes. **Am J Hum Genet** 2018; 103:3-18.

Xing W, Xiao Y, Lu X, et al. GFI1 downregulation promotes inflammation-linked metastasis of colorectal cancer. **Cell Death Differ** 2017; 24:929-43.

Yu H, Hemminki A, Sundquist K, Hemminki K. Familial associations of colon and rectal cancers with other cancers. **Dis Colon Rectum** 2019; 62:189-95.

Zakaria D. The impact of multiple primary rules on cancer statistics in Canada, 1992 to 2012. **J Registry Manag** 2018; 45:8-20.

Zheng G, Chattopadhyay S, Försti A, Sundquist K, Hemminki K. Familial risks of second primary cancers and mortality in ovarian cancer patients. **Clin Epidemiol** 2018; 10:1457-66.

Anexo 1 – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP



**A.C. Camargo
Cancer Center**

Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP

APROVAÇÃO

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 **04/10/2016**, após analisarem a resposta ao questionamento realizado pela CONEP, **aprovaram** a realização do projeto nº 2136/15 intitulado: “**Caracterização de alterações genômicas em pacientes portadores de múltiplos tumores primários**”.

Pesquisador responsável: Dra. Sílvia Regina Rogatto,
Aluna: Tatiane Ramos Basso (Doutorado).

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

São Paulo, 13 de outubro de 2016.

Atenciosamente,

Dra. Sandra Cafres Serrano
2ª Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa

1/1