



**Ministério da Saúde**  
**Instituto Nacional de Câncer**  
**Coordenação de Pós-graduação**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER**  
**Pós-Graduação em Oncologia**

*VANESSA DOS SANTOS MENDONÇA SILVA*

*ANÁLISE DO RETINOBLASTOMA COM PAINEL DE 160 GENES*

**Orientador:** Prof. Dr. Hector Nicolas Seuánez Abreu  
**Co-Orientadora:** Dr. Anna Claudia Evangelista dos Santos

**RIO DE JANEIRO**  
**2019**



**Ministério da Saúde**  
**Instituto Nacional de Câncer**  
**Coordenação de Pós-graduação**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER**  
**Pós-Graduação em Oncologia**

*VANESSA DOS SANTOS MENDONÇA SILVA*

*ANÁLISE DO RETINOBLASTOMA COM PAINEL DE 160 GENES*

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Oncologia.

**Orientador:** Prof. Dr. Hector Nicolas Seuánez Abreu

**Co-orientadora:** Dr. Anna Claudia Evangelista dos Santos

**RIO DE JANEIRO**  
**2019**

S586a Silva, Vanessa dos Santos Mendonça  
Análise do retinoblastoma com painel de 160 genes / Vanessa dos Santos Mendonça Silva. – Rio de Janeiro, 2019.  
118f.: il. color.  
Dissertação (Mestrado em Oncologia) – Programa de Pós-Graduação em Oncologia, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2019.

Orientadora: Dr. Hector Nicolas Seuánez Abreu  
Co-Orientador: Dra. Anna Claudia Evangelista dos Santos

1. Retinoblastoma. 2. Genes Supressores. 4. Técnicas Genéticas. 5. Genes do Retinoblastoma. 6. Mutação. I. Abreu, Hector Nicolas Seuánez (Orient.). II. Santos, Anna Claudia Evangelista (Co-Orient.). III. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. III. Título.

CDD 616.99400735

Catálogo na fonte  
Kátia Simões CRB7/595



**Ministério da Saúde**  
**Instituto Nacional de Câncer**  
**Coordenação de Pós-graduação**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER**  
**Pós-Graduação em Oncologia**

***AUTOR: VANESSA DOS SANTOS MENDONÇA SILVA***

**ANÁLISE DO RETINOBLASTOMA COM PAINEL DE 160 GENES**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Hector Nicolas Seuánez Abreu**  
**CO-ORIENTADORA: Dr. Anna Claudia Evangelista dos Santos**

**Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_**

**EXAMINADORES:**

**Profa. Dra.** Eliana S.F.W. Abdelhay - **Presidente**  
**Profa. Dra.** Cíntia Barros Santos Rebouças  
**Prof. Dr.** Fernando Regla Vargas  
**Profa. Dra.** Sheila Coelho Soares Lima - **Suplente I**  
**Profa. Dra.** Tatiana de Almeida Simão - **Suplente II**

**RIO DE JANEIRO**  
**2019**

*Dedico este trabalho à minha mãe (Neuzelir) e à minha avó (Neusa) que me apoiaram em todos os momentos.*



**Ministério da Saúde**  
**Instituto Nacional de Câncer**  
**Coordenação de Pós-graduação**

**ANÁLISE DO RETINOBLASTOMA COM PAINEL DE 160 GENES**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Vanessa dos Santos Mendonça Silva**

**RESUMO**

O retinoblastoma é um tumor maligno da infância, ocorrendo geralmente antes dos cinco anos de idade. As alterações do gene *RB1* são a principal causa, sendo ambos os alelos afetados nos retinoblastos, apesar de uma pequena parte dos tumores ser de etiologia incerta. A maioria das mutações constitutivas no *RB1* consiste em substituições de um ou poucos nucleotídeos, porém, em cerca de 15% dos casos podem ocorrer grandes deleções ou ampliações, que podem se estender a toda a região cromossômica 13q14 onde o *RB1* está localizado. Estes grandes rearranjos podem não ser identificados por sequenciamento de Sanger, mas são detectados pelo *Multiplex Ligation Probe-dependent Amplification* (MLPA). Neste trabalho foram analisadas por MLPA 61 amostras de DNA de sangue que não tinham apresentado alterações por sequenciamento de Sanger no Programa de Aconselhamento Genético em Câncer do Instituto Nacional de Câncer (INCA). Esta análise mostrou que 57 dessas amostras não apresentavam alterações. Onze dessas amostras possuíam amostras pareadas de DNA tumoral que foram adicionadas a outras 48 amostras tumorais de pacientes cujas amostras pareadas de sangue previamente analisadas não tinham mostrado mutações no *RB1* ou alterações detectadas por MLPA. A integridade das 59 amostras tumorais, testada por qPCR, selecionou 24 para posterior análise com suas respectivas amostras pareadas de DNA de sangue. Os 24 pares de amostras foram analisados com um painel de 160 genes (contendo *RB1* + outros 159 genes) por sequenciamento de nova geração (NGS). As variantes encontradas foram classificadas segundo critérios do American College of Medical Genetics and Genomics. Esta análise mostrou 136 mutações patogênicas em 63 genes, sendo 103 descritas pela primeira vez. No *RB1* foram encontradas: duas mutações constitutivas patogênicas devido a maior sensibilidade do NGS em relação ao sequenciamento de Sanger previamente utilizado, 11 alterações somáticas patogênicas e 15 variantes do *RB1* de significado incerto (VUS). O número de mutações em outros 62 genes encontrou-se significativamente associado à presença do *RB1* mutado e a tumores unilaterais. A distribuição de mutações mostrou ser muito desigual entre pacientes e sete pacientes não mostraram mutações patogênicas. *BCOR* apresentou-se mutado somente em amostras tumorais com mutação no *RB1*, e *BRAF* somente em tumores sem mutação no *RB1*. *TSC1* e *MAP2K1* apresentaram-se mutados somente em tumores de pacientes com apresentação bilateral. Análise das vias biológicas mostrou que os genes mutados participavam de vias de transdução de sinal e transcrição gênica. Em relação a variações do número de cópias (CNV), todos os genes do painel apresentaram alterações (deleções ou ampliações) em, no mínimo, 30% das amostras tumorais. Foram encontradas cinco deleções completas do *RB1* confirmadas por MLPA nas amostras tumorais. Nos outros 159 genes, a amplificação foi o evento mais frequente de CNV nos tumores. Conjuntos significativamente diferentes de genes encontraram-se amplificados em tumores de pacientes com ou sem mutação no *RB1*. Em relação a deleções, a deleção do gene *CRLF2* foi mais frequente em tumores com mutação no *RB1*. Os achados deste estudo contribuirão ao Programa de Aconselhamento Genético em Câncer do INCA.



**Ministério da Saúde**  
**Instituto Nacional de Câncer**  
**Coordenação de Pós-graduação**

**ANÁLISE DO RETINOBLASTOMA COM PAINEL DE 160 GENES**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Vanessa dos Santos Mendonça Silva**

**ABSTRACT**

Retinoblastoma is a childhood malignancy, generally occurring before five years of age. Its etiology is associated to alterations in the *RB1* gene resulting in biallelic disfunction in retinoblasts although, in a small fraction of these tumors, their etiology is uncertain. Most constitutive, *RB1* mutations consist of one or few nucleotide substitutions but in some 15% of cases, large deletions or amplifications may extend to the entire 13q14 chromosome region where *RB1* is located. These large rearrangements may not be identified by Sanger sequencing but can be detected by Multiplex Ligation Probe-dependent Amplification (MLPA). In this work, 61 blood DNA samples without apparent alterations by Sanger sequencing carried out by the Cancer Genetic Counseling Program of the National Cancer Institute (INCA) were analyzed by MLPA. This analysis showed that 57 of these samples did not show alterations. Eleven of their matched, tumor DNA samples were added to 48 other tumor samples from patients whose previously analyzed blood samples had not shown *RB1* mutations or MLPA alterations. The integrity of the 59 tumor samples was tested by qPCR and 24 were selected for further analysis with their paired, blood DNA samples. The 24 sample pairs were analyzed with a panel of 160 genes (containing *RB1* and other 159 genes) by next-generation sequencing (NGS). Variants were classified according to the criteria of the American College of Medical Genetics and this analysis showed 136 pathogenic mutations in 63 genes, including 103 novel mutations. In *RB1*, two constitutive, pathogenic mutations were identified due to the higher sensitivity of NGS with respect to the previously used Sanger sequencing, as well as 11 somatic, pathogenic alterations and 15 *RB1* variants of uncertain significance (VUS). The number of pathogenic mutations in 62 other genes was significantly associated to the presence of *RB1* mutations and unilateral tumors. Mutations were unequally distributed among patients, and seven patients did not carry pathogenic mutations. *BCOR* was mutated only in tumor samples with an *RB1* mutation, and *BRAF* only in tumors without an *RB1* mutation. *TSC1* and *MAP2K1* were mutated only in tumors of patients with bilateral presentation. Analysis of biological pathways showed that mutated genes participated in signal transduction and gene transcription pathways. With respect to copy number variation (CNV), all genes in the panel showed alterations (deletions or amplifications) in at least 30% of tumor samples. Five complete *RB1* deletions were found in tumor samples which were confirmed by MLPA. In the other 159 genes, amplification was the most frequent CNV event in tumors. Significantly different sets of genes were found to be amplified in tumors with and without *RB1* mutations. The *CRLF2* deletion was more frequent in tumors with an *RB1* mutation. The findings of this study will contribute to the INCA Cancer Genetic Counseling Program.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Organização das células da retina..	3
Figura 1.2: Precusores das células da retina, perda de função do <i>RB1</i> e desenvolvimento de retinoblastoma.	3
Figura 1.3: Mecanismo de ação da pRB..	8
Figura 1.4: Outras funções desempenhadas pela proteína RB.	8
Figura 3.1: Fluxograma resumindo o desenho experimental do estudo.	12
Figura 3.2: Método para cálculo das frequencias de mutações patogênicas.	32
Figura 4.1: (A) Heredograma da família e (B) MLPA da paciente nº 30.	35
Figura 4.2: (A) Heredograma da família e (B) MLPA do paciente nº 92.	37
Figura 4.3: (A) Heredograma da família e (B) MLPA do paciente nº 94.	38
Figura 4.4: (A) Heredograma da família e (B) MLPA do tumor do paciente nº 104.	39
Figura 4.5: Análise da qualidade do DNA tumoral pela plataforma TapeStation.	40
Figura 4.6: Porcentagem de cobertura da região alvo do painel de 160 genes.	40
Figura 4.7: Eletroforese de amostras com diferentes coberturas.	40
Figura 4.8: - Proteína RB, seus domínios e locais afetados pelas mutações patogênicas.	42
Figura 4.9: MLPA de DNA de sangue e tumor em parafina.	45
Figura 4.10: Heredograma da família da paciente nº 03.	46
Figura 4.11: Mutação constitutiva encontrada na amostra S03.	47
Figura 4.12: MLPA do tumor do paciente nº 06.	47
Figura 4.13: MLPA do tumor da paciente nº 16.	48
Figura 4.14: MLPA do tumor do paciente nº 31.	49
Figura 4.15: MLPA do tumor do paciente nº 37.	50
Figura 4.16: MLPA do tumor do paciente nº 46.	51
Figura 4.17: MLPA do tumor do paciente nº 58.	51
Figura 4.18: Heredograma da família da paciente nº 64.	52
Figura 4.19: MLPA do tumor do paciente nº 66.	53
Figura 4.20: Heredograma da família do paciente nº 75.	54
Figura 4.21: MLPA do tumor da paciente nº 75.	54
Figura 4.22: Mutação constitutiva encontrada na amostra S80.	55
Figura 4.23: - MLPA do tumor do paciente nº 80	56
Figura 4.24: MLPA dos tumores dos pacientes nº 41 e nº 59	57

Figura 4.25: Genes com mutações patogênicas. ....	61
Figura 4.26: Número de mutações patogênicas em amostras com e sem o gene <i>MLL2</i> mutado .....	62
Figura 4.27: Frequência de mutações patogênicas em tumores com e sem mutação patogênica no <i>RB1</i> . ....	63
Figura 4.28: Frequência de mutações patogênicas em tumores de pacientes com apresentação uni e bilateral. ....	66
Figura 4.29: Representação geral das vias biológicas. ....	68
Figura 4.30: Eventos de CNV por gene analisado. ....	70
Figura 4.31: Eventos de CNV por gene e por amostra analisados analisado.....	71
Figura 4.32: Eventos de CNV nas regiões cromossômicas 1q, 2p e 6p.....	73

## LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Localização das sondas utilizadas para controle da reação de MLPA. ...	15
Tabela 3.2: Lista dos 160 genes analisados no presente estudo.....	20
Tabela 3.3: Definição dos critérios utilizados para classificação de variantes benignas .....	26
Tabela 3.4: Definição dos critérios utilizados para classificação de variantes patogênicas.....	27
Tabela 3.5: Iniciadores utilizados para amplificação do exon 8 e intron 20 do <i>RB1</i> ..	30
Tabela 4.1: Informações sobre a corrida de NGS .....	41
Tabela 4.2: Mutações patogênicas no gene <i>RB1</i> .....	43
Tabela 4.3: Busca das mutações patogênicas em diversos bancos de dados .....	44
Tabela 4.4: Análises de associação entre características dos pacientes e presença de alteração no gene <i>RB1</i> .....	58
Tabela 4.5: Variantes de significado incerto no gene <i>RB1</i> .....	59
Tabela 4.6: Dados dos pacientes com variantes no gene <i>RB1</i> de significado incerto .....	60
Tabela 4.7: Principais vias em que os genes mutados participavam. ....	69
Tabela 4.8: Diferenças significativas de amplificação entre amostras tumores com o <i>RB1</i> mutado e não mutado.....	74
Tabela 5.1: Alterações do gene <i>RB1</i> após análise com painel... ..	81

## SUMÁRIO

RESUMO.....	v
ABSTRACT .....	vi
SUMÁRIO.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Histórico do retinoblastoma (RB).....	1
1.2. O Retinoblastoma como entidade tumoral.....	2
1.2.1 Aspectos epidemiológicos do retinoblastoma.....	4
1.2.2 Características clínicas do retinoblastoma .....	5
1.2.2.1 Síndrome de Deleção 13q associada ao retinoblastoma .....	5
1.2.3 Aspectos Genéticos do retinoblastoma .....	6
1.2.3.1 Histórico do gene <i>RB1</i> ( <i>Retinoblastoma 1</i> ).....	6
1.2.3.2 O gene <i>RB1</i> , suas funções e alterações.....	7
1.2.3.3 Outras alterações genéticas associadas ao retinoblastoma .....	9
1.2.3.4 O Programa de Aconselhamento Genético do Instituto Nacional de Câncer (INCA).....	10
2. OBJETIVOS.....	11
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	11
3.1. Pacientes.....	11
3.2. Obtenção de amostras de DNA de sangue periférico de pacientes .....	13
3.3. Obtenção de amostras de sangue para controle de reações .....	13
3.4. Isolamento de DNA das amostras de sangue periférico.....	13
3.5. MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) em 61 amostras de DNA de sangue .....	14
3.5.1 Reações de MLPA.....	14
3.5.2 Eletroforese capilar dos produtos de MLPA e análise dos resultados .....	16
3.6. Obtenção de amostras de tumores fixados em formalina e embebidos em parafina (FFPE).....	16
3.7. Obtenção de amostras de retina normal.....	17
3.8. Isolamento de DNA das amostras tumorais e de retina normal.....	17
3.9. Avaliação da qualidade das amostras de tumores FFPE .....	17
3.10. Investigação de alterações em genes associados ao câncer.....	18
3.11. Seleção de amostras tumorais por PCR em tempo real (qPCR).....	18
3.12. Análise dos resultados de qPCR .....	19
3.13. Enriquecimento por PCR multiplex e preparo das amostras pareadas .....	21

3.14.	Preparo das bibliotecas para sequenciamento de nova geração (NGS) .....	21
3.15.	Diluição das bibliotecas .....	22
3.16.	Clusterização .....	23
3.17.	Corrida de Sequenciamento na plataforma Illumina HiSeq 2500 .....	23
3.18.	Análise dos dados .....	24
3.18.1	Seleção de variáveis de alta confiabilidade .....	24
3.18.2	Classificação das variantes.....	24
3.19.	Sequenciamento de Sanger para validação de variantes constitutivas no <i>RB1</i> .....	29
3.20.	Análise da variação do número de cópias (CNV) dos genes do painel .....	31
3.20.1	MLPA em amostras tumorais para validação de dados de CNV .....	31
3.21.	Análise de associação entre alterações somáticas e características clínico-patológicas .....	31
4.	RESULTADOS.....	34
4.1.	MLPA em sangue periférico .....	34
4.1.1	Descrição de casos .....	34
4.1.1.1	Paciente nº 30.....	34
4.1.1.2	Paciente nº 92.....	35
4.1.1.3	Paciente nº 94.....	36
4.1.1.4	Paciente nº 104.....	38
4.2.	Painel de genes em amostras pareadas .....	39
4.2.1	Considerações técnicas na utilização do painel de genes.....	39
4.2.2	Avaliação dos dados de NGS com painel de genes .....	41
4.2.3	Mutações no gene <i>RB1</i> com potencial patogênico.....	41
4.2.4	Descrição de casos com alterações patogênicas no <i>RB1</i> .....	46
4.2.4.1	Paciente nº 03.....	46
4.2.4.2	Paciente nº 06.....	47
4.2.4.3	Paciente nº 13.....	48
4.2.4.4	Paciente nº 16.....	48
4.2.4.5	Paciente nº 21 .....	49
4.2.4.6	Paciente nº 31 .....	49
4.2.4.7	Paciente nº 37.....	50
4.2.4.8	Paciente nº 46.....	50
4.2.4.9	Paciente nº 58.....	51
4.2.4.10	Paciente nº 60.....	52

4.2.4.11	Paciente nº 64.....	52
4.2.4.12	Paciente nº 66.....	53
4.2.4.13	Paciente nº 75.....	53
4.2.4.14	Paciente nº 80.....	55
4.2.4.15	Paciente nº 86.....	56
4.2.5	Pacientes sem alterações patogênicas no RB1.....	56
4.2.6	Análise de associação entre alterações patogênicas no RB1 e características clínico-patológicas.....	57
4.2.7	Variantes de significado incerto (VUS) no gene RB1.....	58
4.2.8	Mutações com potencial patogênico em outros 159 genes associados a câncer.....	60
4.2.9	Análise de associação entre presença de mutações nos 159 genes e presença de mutações no gene RB1 e lateralidade do tumor.....	63
4.3.	Análise de vias biológicas.....	67
4.4.	Análise da variação do número de cópias (CNV).....	70
5.	DISCUSSÃO.....	76
5.1.	MLPA em amostras de sangue periférico de pacientes sem mutações patogênicas constitutivas previamente detectadas por sequenciamento de Sanger.....	76
5.2.	Identificação de mutações patogênicas em amostras pareadas.....	78
5.2.1	Alterações patogênicas no RB1 detectadas por NGS.....	79
5.2.2	Variantes do RB1 de significado incerto (VUS).....	80
5.2.3	Resumo da análise do RB1.....	81
5.2.4	Mutações em outros 159 genes.....	82
5.2.5	Associação entre presença de mutação no RB1, presença de mutação em outros genes e lateralidade.....	84
5.2.6	Pacientes sem alterações patogênicas no RB1 e sem mutações nos outros 159 genes.....	86
5.2.7	Análise de vias biológicas dos genes mutados.....	87
5.3.	Análise da variação de número de cópias (CNV) em 159 genes.....	88
5.3.1	Associação entre CNV, presença de mutação no RB1 e lateralidade.....	90
6.	CONCLUSÃO.....	92
7.	REFERÊNCIAS.....	94
8.	ANEXOS.....	111

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Histórico do retinoblastoma (RB)

O primeiro registro de um tumor semelhante ao retinoblastoma ocorreu em 1597 através dos relatos de uma autópsia realizada pelo anatomista de Amsterdam Petrus Pawius. O caso tratava-se de uma criança do sexo masculino de três anos de idade que apresentava um grande tumor no olho esquerdo comprometendo a órbita, região temporal e alcançando o crânio, sugerindo fortemente retinoblastoma não tratado (KIVELÄ; POLKUNEN, 2003).

Após este registro inicial e de um grande intervalo, de aproximadamente 150 anos, nenhum novo caso semelhante ao RB foi relatado. Em 1767, um novo caso foi descrito por William Hunter, um anatomista e médico escocês que usou a expressão “*cat's eye in the dark*” (do inglês: olhos de gato no escuro) para se referir ao que hoje conhecemos como “leucocoria” (das palavras gregas *leukos* = branco *ekoria* = pupila), o sintoma mais comum (75%) entre os pacientes com retinoblastoma, que consiste em um reflexo pupilar anormal esbranquiçado. Neste relato, o tumor apresentava-se de forma bilateral em uma criança do sexo feminino de apenas três anos (ALBERT, 1987; JÚNIOR *et al.*, 2004; SELISTRE *et al.*, 2016).

Em 1806 o cirurgião inglês William Hey incluiu tumores que afetavam o globo ocular causando ampliação e destruição da sua organização interna em um termo que englobava também tumores que ele encontrava distribuídos geralmente nos membros e no peitoral, *Fungus haematodes* (MOSCHOS, 2017). Este termo permaneceu sendo aplicado a retinoblastoma por vários anos, e em 1953, em trabalho sobre “glioma da retina” (outro termo atribuído ao retinoblastoma), Dollfus e Auvert (1953) citaram cerca de outras 40 nomenclaturas para se referir ao retinoblastoma.

Visando fixar limites precisos para o uso do termo “*fungus haematodes*” que estava sendo largamente utilizado, o cirurgião escocês James Wardrop em 1809 conseguiu demonstrar que fatos e observações de diversos autores referiam-se ao mesmo tumor ocular e que essa malignidade frequentemente envolvia crianças. Sua meticulosa dissecação desses tumores levou à conclusão de que estes desenvolviam-se a partir da retina (WARDROP, 1809).

Os primeiros casos de RB trilateral só foram descritos entre os anos 1976 e 1977 com relatos de ocorrência de retinoblastomas ectópicos no corpo pineal ou em

região paraselar (ABRAMSON; ELLSWORTH; ZIMMERMAN, 1976; JAKOBIEC *et al.*, 1977).

## **1.2. O Retinoblastoma como entidade tumoral**

O retinoblastoma (RB, OMIM 180200) é o tumor ocular maligno mais comum na infância, compreendendo cerca de 4% de todas as neoplasias pediátricas (ABRAMSON, 2005). O RB é um tumor embrionário, derivado dos retinoblastos, especialmente das células cones-precursoras da retina (BREMNER; SAGE, 2014; XU *et al.*, 2014)

A retina é formada por uma diversidade de células nervosas que captam a luz, realizando a sua transdução e transmitindo a informação ao nervo ótico, que por sua vez a transmite para o cérebro. Organiza-se basicamente em duas áreas: sensorial e epitélio pigmentar. O epitélio pigmentar é uma monocamada responsável por absorver a luz dispersa e estocar vitamina A, que auxilia no funcionamento da retina em momentos de pouca iluminação, além de permitir as trocas metabólicas com a coróide, estrutura rica em vasos sanguíneos (ZHONG *et al.*, 2012; YOUNG *et al.*, 2010). O epitélio pigmentar também é responsável pela manutenção da retina por renovar os fotorreceptores e realizar fagocitose de antigos cones e bastonetes (FENSTERSEIFER *et al.*, [s.d.]; MARK F; BARRY W; MICHAEL A, 2017).

A área sensorial abrange as células especializadas da retina, sendo composta por cinco tipos diferentes de células: as células ganglionares (células nervosas cujos axônios formam o nervo ótico), as células bipolares, os fotorreceptores (cones e bastonetes), as células horizontais e as células amácrinas (YOUNG *et al.*, 2010). Estas células são dispostas em camadas como demonstrado na Figura 1.1.

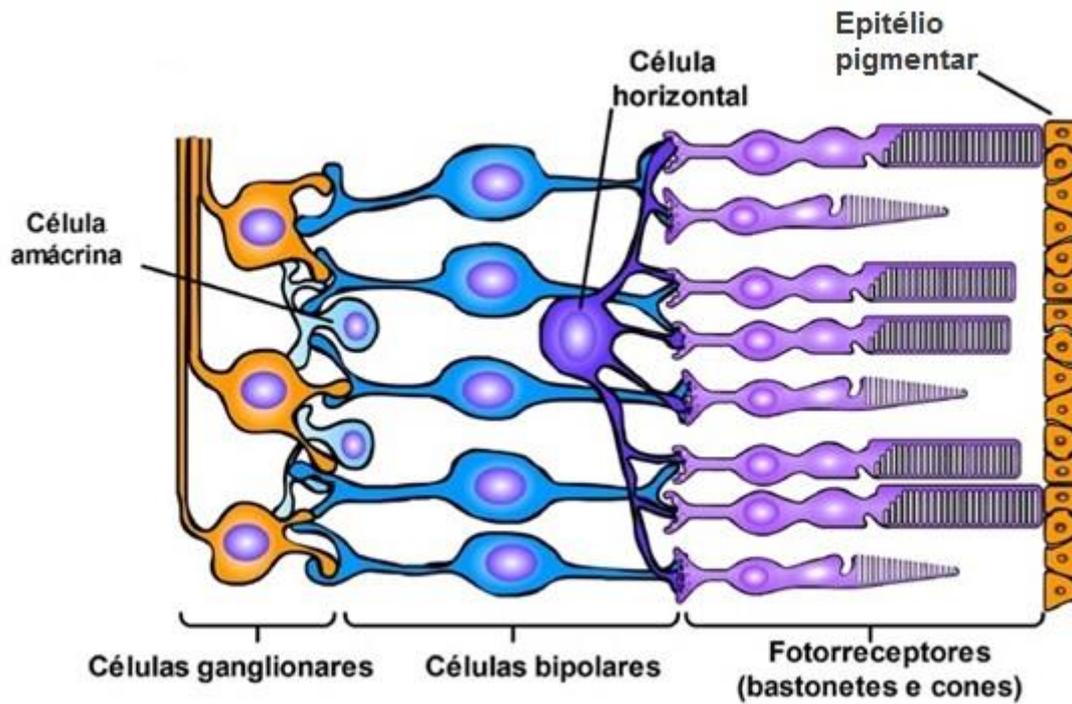


Figura 1.1: Organização das células da retina. Adaptado de <<https://docplayer.com.br/40671896-Fisiologia-vias-afereentes-sistema-nervoso.html>>. Acesso em 20 nov. 2019.

Como mostra a Figura 1.2, apesar das células progenitoras da retina originarem sete diferentes células, somente a perda de função do *RB1* naquelas que estão se diferenciando em células cone é capaz de causar o retinoblastoma (BREMNER; SAGE, 2014).

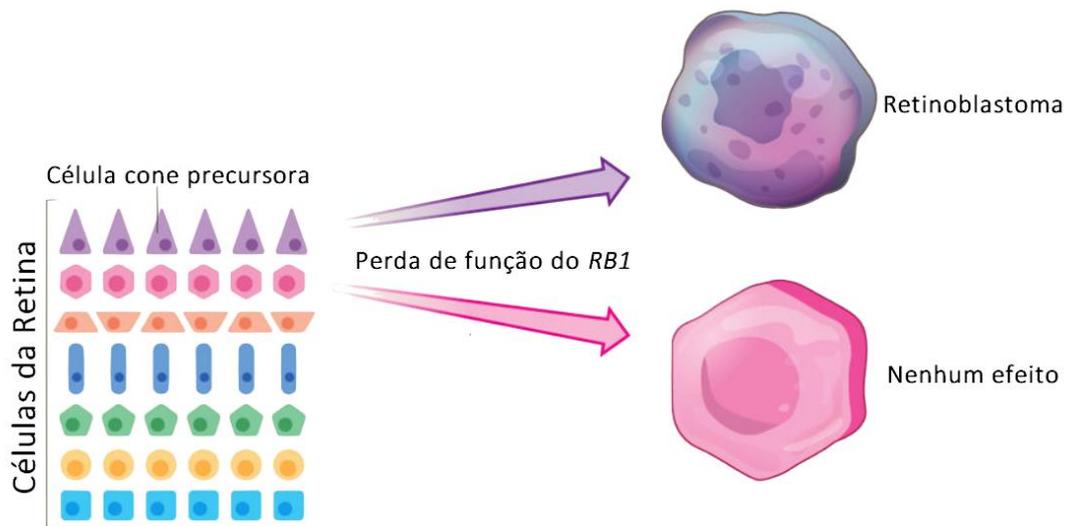


Figura 1.2: Precursores das células da retina, perda de função do *RB1* e desenvolvimento de retinoblastoma. Adaptado de Bremner e Sage, 2014.

Por seu papel imprescindível na visão, danos ou irregularidades na retina podem levar à cegueira. No Brasil, doenças da retina são a causa mais comum de cegueira em adulto (SALOMÃO; MITSUHIRO; BELFORT, 2009). Em crianças a retina é a segunda principal estrutura anatômica relacionada a alterações oculares (RIBEIRO BRITO; VEITZMAN, 2000).

Dentre essas alterações se encontra o retinoblastoma, que pode causar, além do acometimento visual, destruição das estruturas intra-oculares e, quando não tratado, pode ultrapassar os limites do globo ocular, invadindo a órbita, o nervo óptico até mesmo o sistema nervoso central, podendo ser fatal (BENCKE; CANEVESE, 2018).

### *1.2.1 Aspectos epidemiológicos do retinoblastoma*

A incidência global do retinoblastoma varia entre 1/16.000-18.000 nascidos vivos por ano (BARTUMA *et al.*, 2014). De Camargo e colaboradores (2010) enfatizaram a relevante variação mundial da incidência de retinoblastoma indo de 4/1.000.000, ao considerar crianças norte-americanas entre 0 a 14 anos, até altas taxas como em Chiapas no México que chega a 21 casos por milhão.

No Brasil são estimados 189 novos casos por ano (ONE RETINOBLASTOMA WORLD, 2015) com incidência relativamente alta, atingindo mais de 11 casos por milhão em sete dos 14 Registros de Câncer Base Populacional (PBRC) existentes no Brasil ao considerar crianças entre 0-4 anos. Em Natal, a taxa de incidência ajustada para a mesma faixa etária chega aos 27 casos por milhão (DE CAMARGO *et al.*, 2010).

Apesar da maioria dos artigos relatarem a falta de evidências válidas de variações geográficas ou raciais na incidência do retinoblastoma (KRISHNA; YU; FINGER, 2009; MORENO *et al.*, 2014; TRUONG *et al.*, 2015), já foi descrito que em crianças de nacionalidade hispânica as taxas de enucleação são mais elevadas do que em crianças brancas não hispânicas, além de uma maior probabilidade de apresentar doença extraocular (TRUONG *et al.*, 2015). A maior parte da literatura não mostra associação entre aumento da incidência da neoplasia e sexo da criança (SENFT *et al.*, 1988; K. KAISER *et al.*, 2003; BROADDUS; TOPHAM; SINGH, 2009) mas alguns estudos afirmam uma maior prevalência no sexo masculino (SELISTRE *et al.*, 2016). Apesar da faixa etária mais frequente dos acometidos pelo RB ser

compreendida entre o nascimento e cinco anos, alguns casos em adultos jovens já foram relatados (SINGH *et al.*, 2011).

### 1.2.2 Características clínicas do retinoblastoma

No RB as manifestações fenotípicas mais frequentes são a leucocoria (presente em 60% dos casos), que corresponde a um reflexo pupilar branco e o estrabismo (presente em 20% dos casos) (BALMER; ZOGRAFOS; MUNIER, 2006). O tumor pode se manifestar unilateralmente (em um dos olhos) ou bilateralmente (nos dois olhos), apresentando um ou múltiplos focos.

A caracterização de alterações genéticas constitutivas é de grande importância, pois podem indicar uma maior chance de desenvolvimento de outras doenças, como deficiência intelectual e/ou deficiência motora (JONES, 1998). Nos casos hereditários, a criança que é portadora de uma mutação constitutiva no gene *RB1*, tem 90% de chance de desenvolver tumor uni ou bilateral, além do risco de desenvolver outras neoplasias não oculares como osteossarcomas e sarcomas de partes moles (DICOMMO; GALLIE; BREMNER, 2000). A identificação do primeiro evento mutacional no gene *RB1* possibilita o estabelecimento de estratégias de prevenção através do aconselhamento genético das famílias portadoras, sendo essencial para elucidar o risco de desenvolvimento de múltiplos tumores, que é para esses indivíduos superior ao da população.

#### 1.2.2.1 Síndrome de Deleção 13q associada ao retinoblastoma

A Síndrome de deleção 13q, descrita em 1963 (LELE; PENROSE; STALLARD, 1963), é um conjunto de sinais e sintomas desencadeados em decorrência da perda do material genético do braço longo (q) do cromossomo 13 (CHROMOSOME 13Q DELETION, 2016).

A gravidade da condição e os sinais e sintomas desenvolvidos dependem do tamanho e da localização da deleção e dos genes envolvidos. Pacientes cuja deleção acomete regiões compreendidas entre 13q12 e 13q31 podem apresentar deficiência intelectual em grau leve ou moderado, retardo no desenvolvimento, anomalias, dismorfias e retinoblastoma caso tenham a região 13q14 afetada (BESTETTI *et al.*, 2018). A região 13q32 quando deletada está relacionada, principalmente, a alterações como deficiência intelectual severo, deficiência do

crescimento, microcefalia e malformações gastrointestinais. A falta das regiões 13q33 e 13q34 podem levar a deficiência intelectual severo, porém sem deficiência do crescimento ou grandes malformações estruturais (JONES, 1998).

### 1.2.3 Aspectos Genéticos do retinoblastoma

#### 1.2.3.1 Histórico do gene *RB1* (*Retinoblastoma 1*)

Anteriormente ao século XIX o conhecimento sobre a possível transmissão hereditária do RB era inexistente, pois esse tumor ainda não estava bem caracterizado e não havia sobreviventes. Em 1821, 12 anos após a descrição do RB por Wardrop, foram relatadas as primeiras associações desta neoplasia com a herança. O caso tratava-se de uma família com sete crianças, sendo quatro delas portadoras do tumor. Apesar do cenário indicativo de uma mutação constitutiva, que geralmente ocorre com apresentação bilateral, apenas uma das crianças possuía a neoplasia nos dois olhos (LERCHE, 1921). Posteriormente no Brasil, em 1886, um caso apontava para a possível herança relacionada ao RB (GOUVÊA, 1886; MONTEIRO; WAIZBORT, 2007). Tratava-se de um sobrevivente de RB que teve a descendência afetada pela neoplasia, porém o caso não teve grande repercussão.

Em 1904, um paciente que sofreu enucleação e sobreviveu ao RB gerou um filho que desenvolveu o mesmo tumor. Além disso, este mesmo paciente possuía uma irmã que, apesar de não apresentar a neoplasia, gerou dois filhos que faleceram devido ao mesmo tumor ocular (PARSONS; RIDLEY, 1906). Era finalmente demonstrada a existência do retinoblastoma em sua forma hereditária.

Ainda na primeira metade do século XX, concluiu-se que os casos esporádicos estavam mais relacionados a tumor unilateral e mutações somáticas, enquanto os casos que envolviam mutação constitutiva apresentavam um tumor bilateral com uma idade de diagnóstico mais precoce (ALBERT, 1987). Em 1971, Knudson mesmo sem saber da existência do gene *RB1* postulou que ambos os alelos de um gene associado ao RB deveriam ser não funcionais para a tumorigênese (KNUDSON, 1971). Quinze anos depois era identificado e clonado o primeiro gene relacionado à câncer, mais especificamente ao retinoblastoma, de onde veio o seu nome: "*Retinoblastoma 1*" (FRIEND *et al.*, 1986).

### 1.2.3.2 O gene *RB1*, suas funções e alterações

O gene *RB1* é constituído por 27 exons que variam entre 31 a 1,899 pares de base (pb) localizado no cromossomo 13, na região 13q14.2. Este gene codifica, através de um transcrito de 4.7 quilobases (kb), uma fosfoproteína nuclear composta por 928 resíduos de aminoácidos, a proteína do retinoblastoma (pRB). Grande parte do gene, é composta de íntrons (regiões cujos transcritos são excluídos), sendo o menor deles com 80pb e o maior com 60kb (TOGUCHIDA *et al.*, 1993). A pRB tem propriedades regulatórias sobre o ciclo celular e é modulada durante a proliferação e diferenciação da célula por fosforilação e desfosforilação. Basicamente, quando fosforilada, a pRB apresenta-se em sua forma inativa e, quando não fosforilada, em sua forma ativa (BUCHKOVICH *et al.*, 1989; CHEN *et al.*, 1989; DECAPRIO *et al.*, 1989). A pRB apresenta-se hipofosforilada em células em repouso (G0), é progressivamente fosforilada através da fase G1 e, posteriormente, mantida em estado hiperfosforilado durante toda a mitose (GIACINTI; GIORDANO, 2006).

A regulação do ciclo celular através da pRB é feita através da elaboração de um complexo formado por esta proteína, a família de fatores de transcrição *E2F* (*Elongation Factor 2*) e o fator de transcrição *DP1*. A junção *E2F-DP* permite a ligação destes aos promotores de genes necessários para a síntese do DNA e a atração das acetilases das histonas, que remodelam a cromatina tornando-a favorável à transcrição. Como mostra a Figura 1.3, quando a pRB está hipofosforilada (ativa) é capaz de se ligar ao conjunto *E2F-DP* e bloquear fisicamente o domínio de transativação de *E2F*, necessário para ativação da transcrição gênica e, ao mesmo tempo, é capaz de atrair histonas deacetilases que tornam a configuração da cromatina incompatível com a transcrição. Em um cenário normal de proliferação celular, ocorre a regulação deste mecanismo através de ciclinas e quinases dependentes de ciclinas, que são responsáveis pela fosforilação da pRB, levando a sua separação da família *E2F-DP* e, conseqüentemente, permitindo que a célula prossiga com o ciclo, entrando na fase de síntese (S) do DNA (WEINBERG, 1995; LUO; POSTIGO; DEAN, 1998; ZHANG; POSTIGO; DEAN, 1999 HARBOUR; DEAN, 2000).

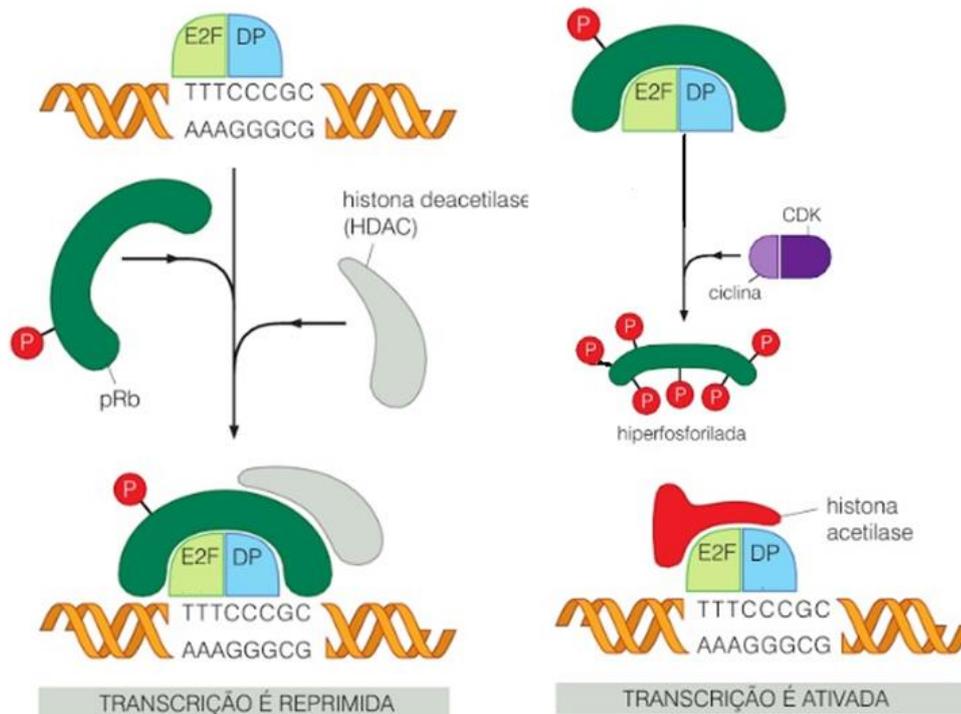


Figura 1.3: Mecanismo de ação da pRB através da interação com o complexo E2F/DP e acetilases e desacetilases das histonas. Adaptada de Weinberg, 1995.

Além do papel fundamental no controle do ciclo celular, a pRB, por interagir com outras proteínas, participa de diversos processos que auxiliam na manutenção da estabilidade genômica (Figura 1.4)

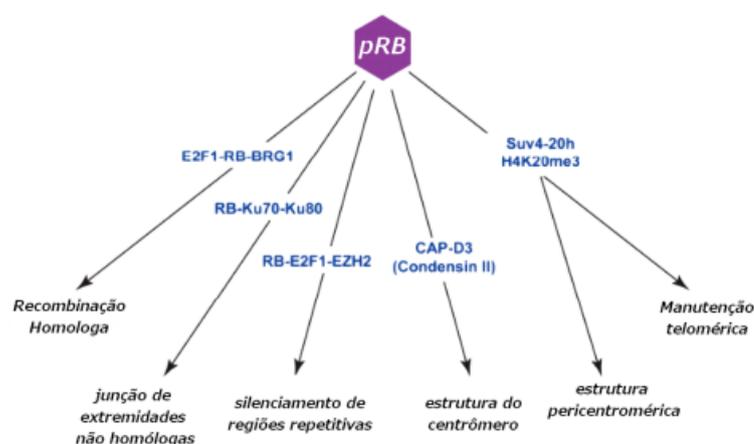


Figura 1.4: Outras funções desempenhadas pela proteína RB. Adaptado de Vélez-Cruz e Johnson (2017).

A disfunção do gene *RB1*, que pode ocorrer através de eventos epigenéticos ou mutacionais, resulta em uma constante proliferação celular. A maioria das mutações constitutivas encontradas no *RB1* consiste em substituições de um ou poucos nucleotídeos (LOHMANN *et al.*, 1996). Porém, em alguns casos, é possível encontrar grandes deleções no *RB1* e/ou na região cromossômica 13q14, assim como variações do número de cópias no gene *RB1* (HARBOUR, 1998; LOHMANN, 1999).

Geralmente o RB é desencadeado pela perda de função dos dois alelos do gene *RB1* nos retinoblastos, células imaturas da retina. Como proposto por Knudson (1971), por se tratar de um gene supressor tumoral, é necessário que ocorra, inicialmente, a inativação de ambos os alelos do gene *RB1* em uma mesma célula para que haja desenvolvimento do tumor. Na forma esporádica, o tumor é causado por duas mutações somáticas nos retinoblastos. Na forma hereditária, o primeiro evento mutacional é herdado de um dos progenitores ou gerado na pós-concepção, resultando em uma mutação constitutiva. Neste último caso o segundo evento mutacional é sempre somático e ocorre nos retinoblastos, determinando o desenvolvimento da neoplasia. Nos casos hereditários, a susceptibilidade de desenvolver RB é transmitida com caráter dominante, enquanto a aparição do tumor é recessiva a nível celular.

### 1.2.3.3 Outras alterações genéticas associadas ao retinoblastoma

Apesar da perda da atividade normal do gene *RB1* gerar instabilidade genômica, permitindo a iniciação e a promoção tumoral, primariamente essa instabilidade leva ao desenvolvimento do retinoma benigno, que progride para o retinoblastoma à medida que alterações genômicas adicionais contribuem para a proliferação celular descontrolada (DI FIORE *et al.*, 2013; DIMARAS *et al.*, 2008). Entre estes eventos adicionais que levam a progressão do retinoma para retinoblastoma já foram descritos ganhos na região 1q32 envolvendo os genes *KIF14* (*Kinesin Family Member 14*) e *MDM4* (*Mouse Double Minute 4 Homolog*), na região 2p24 envolvendo o gene *MYCN* (*V-MycAvianMyelocytomatosis Viral Oncogene Neuroblastoma Derived Homolog*) e ganhos em 7q22 e 12q31. Também foram descritas perdas na região 16q22 envolvendo o gene *CDH11* (*Cadherin 11*) e 16q22.2 envolvendo o gene *RBL2* (*Retinoblastoma-like 2*), além de mutações no

gene *BCOR* (*BCL6 Corepressor*) e ativação epigenética do gene *SYK* (*Spleen Associated Tyrosine Kinase*) (DIMARAS *et al.*, 2015).

Ainda que haja o predomínio das alterações no *RB1* como desencadeador do retinoblastoma, em cerca de 1,4% dos casos não há evidência de variações nesse gene, mas há níveis aumentados do oncogene *NMYC*, descrito como responsável pela tumorigênese nesse cenário. A amplificação do gene *NMYC* foi sugerida como causadora do retinoblastoma em alguns dos casos com *RB1* normal, por levar a uma progressão celular aumentada através da inativação indireta da pRB, sustentando a divisão celular independentemente da ativação da família de fatores de transcrição E2F (RUSHLOW *et al.*, 2013).

Mesmo que a amplificação do *NMYC* justifique a tumorigênese em alguns casos com *RB1* funcional e *NMYC* amplificado, cerca de 1,5% dos casos de retinoblastoma unilateral não-hereditário permanecem enigmáticos por não apresentar alterações nos genes *RB1* ou *NMYC* (RUSHLOW *et al.*, 2013).

#### 1.2.3.4 O Programa de Aconselhamento Genético do Instituto Nacional de Câncer (INCA)

O Programa de Genética do INCA é responsável pelo Aconselhamento Genético em Câncer, atendendo uma média anual de 20 casos/ano de retinoblastoma e recebendo amostras de sangue e tecido de vários centros que integram a Rede Brasileira de Câncer Hereditário (REBRACH). Todos os pacientes com RB que dão entrada no INCA são encaminhados, após consentimento livre e esclarecido dos seus progenitores ou tutores, ao Programa de Aconselhamento Genético.

A detecção de mutação patogênica constitutiva no *RB1* leva a acompanhamento diferenciado do paciente portador por indicar risco aumentado para desenvolvimento de retinoblastoma no outro olho (no caso de unilaterais) e ainda de outros tumores. Enquanto os pacientes sem mutação são avaliados uma vez a cada ano, pacientes com mutação constitutiva são assistidos a cada 15 dias ou 1 mês quando bebês, a cada 4 ou 6 meses até os 4 anos e permanecem em ambulatório de longo prazo, retornando a cada ano.

Este estudo propõe incorporar ao Programa de Aconselhamento Genético do INCA, novas tecnologias de diagnóstico e análise de alterações associadas ao retinoblastoma, mediante análise de um painel de 160 genes, utilizando

sequenciamento de nova geração para análise de amostras pareadas de sangue e tumor.

## **2. OBJETIVOS**

- Identificar por meio de MLPA alterações no gene *RB1* em amostras de DNA de sangue periférico de pacientes que não tinham apresentado mutação patogênica pelo sequenciamento de Sanger.
- Identificar por meio de sequenciamento de Nova Geração (NGS) alterações somáticas no gene *RB1* em pacientes que não apresentaram alterações pelo MLPA em amostras de sangue periférico.
- Identificar alterações constitutivas e somáticas, em amostras pareadas de sangue e tumor, em 160 genes relacionados a câncer, buscando estabelecer uma provável associação entre as alterações desses genes e retinoblastoma.
  - Analisar as vias afetadas pelas mutações somáticas identificadas.
  - Contribuir com os dados para o Programa de Aconselhamento Genético.

## **3. MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1. Pacientes**

Foram analisados pacientes atendidos no INCA entre 1997 e 2017, de acordo com o fluxograma da Figura 3.1 e coletados dados pessoais e clínicos, apresentados junto aos resultados. Este estudo foi inserido no projeto “Estudos Citomoleculares em Retinoblastoma” (protocolo 40/00), aprovado desde 2001 pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Instituto Nacional de Câncer (INCA). O termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) assinado por todos os participantes. A cópia da carta de aprovação pelo CEP está contida no Anexo I.

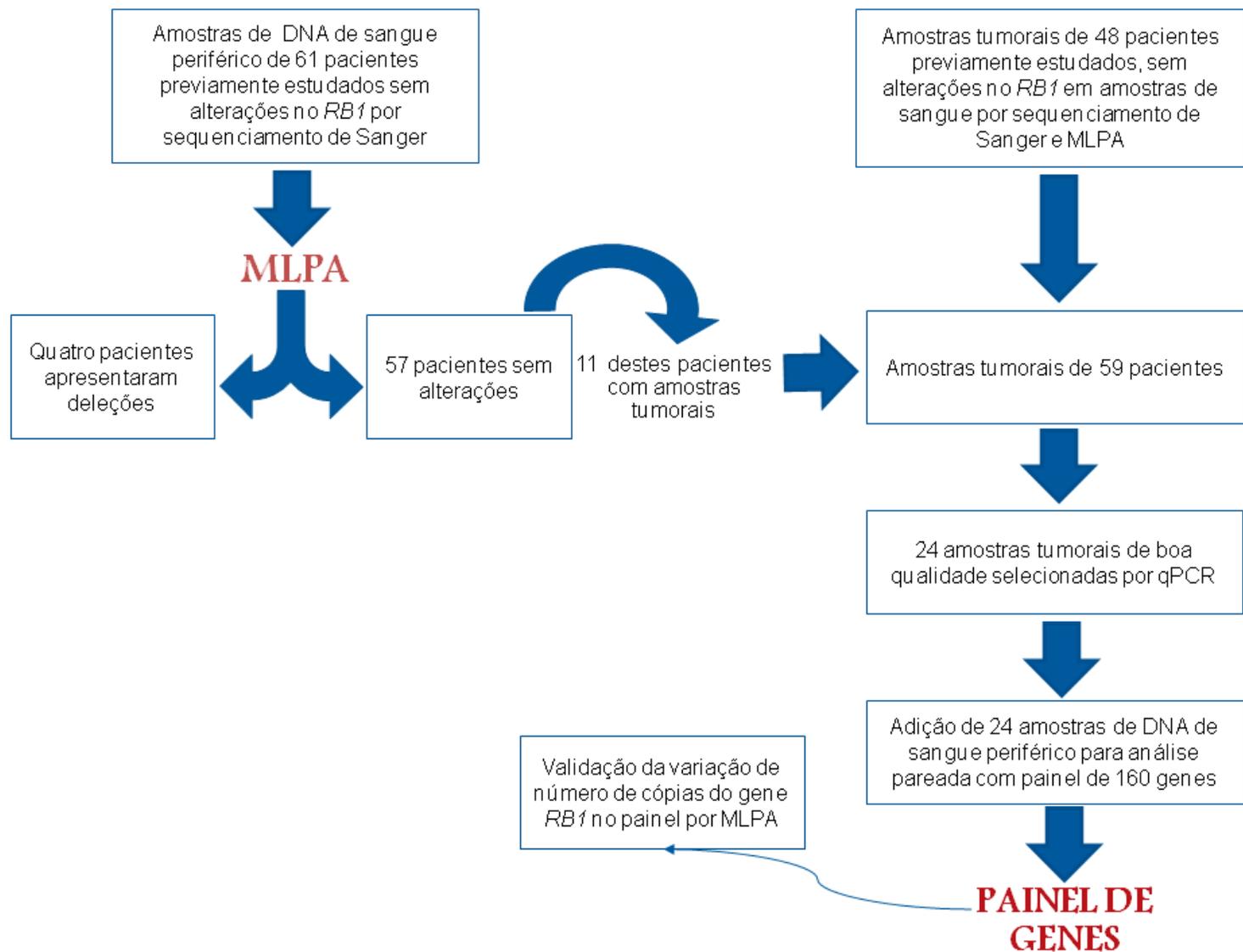


Figura 3.1: Fluxograma resumindo o desenho experimental do estudo.

### **3.2. Obtenção de amostras de DNA de sangue periférico de pacientes**

Amostras de DNA de sangue de 61 pacientes foram disponibilizadas pelo Programa de Aconselhamento Genético do Instituto Nacional de Câncer (INCA). Estes pacientes não tinham apresentado alterações constitutivas no gene *RB1* por sequenciamento de Sanger em amostras de sangue.

### **3.3. Obtenção de amostras de sangue para controle de reações**

Amostras de DNA sangue periférico utilizadas como controle das reações de MLPA realizadas com DNA de sangue periférico foram obtidas de 23 voluntários sadios que compareceram ao Serviço de Hemoterapia do INCA para doação de sangue. Todos os voluntários foram informados sobre o procedimento e aceitaram participar através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). O DNA das amostras de sangue periférico dos voluntários sadios foi isolado pelo método de extração salina (MILLER; DYKES; POLESKY, 1988).

### **3.4. Isolamento de DNA das amostras de sangue periférico**

O isolamento do DNA foi realizado com 2,5ml de sangue periférico coletado em tubo com EDTA. Inicialmente, o sangue periférico foi transferido para tubos de 15ml onde foi adicionado 8,75ml de tampão de lise de hemácias (155mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 10mM  $\text{KHCO}_3$ , 1mM EDTA  $\text{Na}_2$ ). A mistura foi homogeneizada por inversão do tubo e incubada em banho de gelo por 30 minutos, sendo agitada após 15 minutos. Ao fim da incubação, os tubos foram centrifugados a 3.000rpm por 15 minutos e o sobrenadante descartado após centrifugação. O sedimento foi ressuspensionado em outros 10ml de tampão de lise de hemácias e novamente centrifugado a 3.000rpm, desta vez por 10 minutos. O sobrenadante foi novamente descartado e o sedimento ressuspensionado em tampão de lise de núcleos (10mM TRIS pH 8.0, 400mM NaCl, 2mM EDTA  $\text{Na}_2$ ). Os tubos foram agitados no vórtex até que todo conteúdo fosse ressuspensionado. Subsequentemente, foram adicionados, a cada tubo, 150 $\mu\text{l}$  de SDS 20% e 10 $\mu\text{l}$  de proteinase K. Os tubos foram homogeneizados por inversão e incubados a 56°C em banho-maria por 12-16h. Ao fim da incubação 1ml de NaCl 5M foi adicionado, a mistura foi agitada no vórtex por 15 segundos e centrifugada a 3.000rpm por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido a um novo tubo e

centrifugado a 3.000rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo, onde foi adicionado etanol absoluto mantido a  $-20^{\circ}\text{C}$  na proporção 2:1. O tubo foi invertido diversas vezes até que o DNA tornou-se visível formando um único precipitado. Este precipitado foi transferido a um tubo contendo 1ml de etanol 70% a  $-20^{\circ}\text{C}$ , onde permaneceu por 5 minutos. Decorrido esse tempo, o tubo foi centrifugado a 13.000rpm por 15 minutos, o sobrenadante descartado e o tubo permaneceu aberto até que todo o álcool restante evaporasse. O DNA foi ressuspendido em 50 $\mu\text{l}$  de tampão de eluição (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA) e armazenada a  $4^{\circ}\text{C}$ .

### **3.5. MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) em 61 amostras de DNA de sangue**

#### *3.5.1 Reações de MLPA*

As reações de MLPA para análise do gene *RB1* foram realizadas com o conjunto de reagentes “SALSA MLPA KIT PO47 *RB1*” (MRC-Holland®, Amsterdã, Países Baixos) seguindo o protocolo disponibilizado pelo fabricante. O Kit “SALSA MLPA P047 contém quatro sondas para o intron 2 e sondas para todos os exons do gene *RB1* exceto para o exon 15 pela sua proximidade aos 14 e 16. O kit também possui seis sondas complementares a regiões próximas do gene *RB1* para auxiliar na caracterização da extensão das deleções e duplicações. Duas sondas hibridizam-se em regiões a montante do gene *RB1*, no exon 6 do gene *ENOX1* (*Ectonoxdisulfide-thiol exchanger 1*) e no exon 5 do gene *ITM2B* (*Integral membrane protein 2b*), e quatro hibridizam-se em regiões a jusante do gene *RB1*, no exon 8 do gene *RCBTB2* (*RCC1 domain- and BTB domain-containing protein 2*), no exon 2 do gene *DLEU1* (*Deleted in lymphocytic leukemia, 1*) e nos exons 2 e 3 do gene *PCDH8* (*Protocadherin 8*). O kit apresenta ainda 14 sondas com localizações em vários autossomos que são relativamente estáveis em tumores humanos. Essas sondas, utilizadas para controle das reações de MLPA, são apresentadas na Tabela 3.1 de acordo com o local de hibridização.

Tabela 3.1: Localização das sondas utilizadas para controle da reação de MLPA.

Gene	Exon	Posição cromossômica	Gene	Exon	Posição cromossômica
<i>TTC39A</i>	4	1p32.3	<i>SMPD1</i>	2a	11p15.4
<i>SLC9A2</i>	2	2q12.1	<i>COL2A1</i>	35	12q13.11
<i>SATB2</i>	12	2q33.1	<i>MYH7</i>	12	14q11.2
<i>DNAH5</i>	48	5p15.2	<i>UBE3A</i>	6	15q11.2
<i>IL4</i>	1	5q31.1	<i>MYO5B</i>	8	18q2.1
<i>PCSK5</i>	22	9q21.13	<i>KCNJ6</i>	4	21q22.13
<i>MYBPC3</i>	31	11p11.2	<i>LARGE</i>	11	22q12.3

As amostras foram inicialmente quantificadas no NanoDrop ND1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) a 260 nm e tiveram sua concentração ajustada para 20ng/µl. Transferiu-se 5µl destas diluições para tubos de 0,2ml devidamente identificados, que foram levados ao termociclador, onde permaneceram a 98°C por 10 minutos e imediatamente resfriados a 25°C.

Os reagentes SALSA MLPA buffer (tampão) e SALSA probemix (sondas) foram ressuspensos em um vórtex e misturados em uma proporção de 1,5µL de cada reagente por amostra de DNA. Nos tubos contendo o DNA desnaturado mantidos no termociclador a 25°C, alíquotas de 3µL destas misturas foram adicionadas a cada um deles, homogeneizando lentamente as soluções com pipeta. Após a adição dos reagentes, as amostras foram aquecidas a 98°C por 1 minuto e incubadas a 60°C por 18 horas e posteriormente mantidos a 54°C.

Os tampões necessários para a ligação, *Ligase-65 Buffer A* e *Ligase-65 Buffer B* foram separadamente homogeneizados em vórtex. Em seguida, preparou-se uma mistura contendo 3µl de cada tampão, 25µl de água ultrapura e 1µl da enzima *Ligase-65* por amostra. Trinta e dois microlitros dessa mistura foram adicionados a cada tubo mantido a 54°C. Ao fim da adição, os tubos foram incubados nesta temperatura por mais 15 minutos, seguido de inativação da enzima *Ligase-65* por aquecimento a 98°C por 5 minutos. Os tubos foram posteriormente mantidos no termociclador a 20°C até a próxima etapa.

Foi preparada uma mistura, para cada tubo, de 7,5µl de água ultrapura, 0,5µl da enzima SALSA *Polymerase* e 2µl do SALSA PCR *Primer mix* (iniciadores), homogeneizando lentamente as soluções com uma pipeta. A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada em 35 ciclos de três etapas, sendo a desnaturação a 95°C por 30 segundos, o anelamento dos iniciadores a 60°C por 30 segundos e a

extensão a 72°C por 1 minuto. Ao fim dos 35 ciclos, os tubos foram incubados por 20 minutos a 72°C e mantidos a 15° até serem retirados do termociclador. Os produtos da PCR foram armazenados a -20°C em recipientes protegidos da luz até a montagem em placa para eletroforese capilar.

### 3.5.2 Eletroforese capilar dos produtos de MLPA e análise dos resultados

A eletroforese capilar foi realizada nas plataformas ABI-3130XL GeneticAnalyzer ou ABI-3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, Estados Unidos). Para montagem das placas foi preparada uma mistura com 0,2µl do marcador GeneScan™ 500 LIZ® (Applied Biosystems), um padrão de peso molecular para dimensionar fragmentos de DNA na faixa de 35-50pb, e 8,8µl de formamida HiDi™ (referência ABI nº 4311320) por tubo. As misturas foram homogeneizadas e distribuídas nos poços da placa onde foi acrescentado, posteriormente, 0,8µl de cada reação de MLPA por poço. As placas foram aquecidas a 86°C por três minutos, resfriadas a 4°C por dois minutos e posteriormente submetidas a eletroforese capilar com voltagem inicial de injeção de 1,6kV e tempo inicial de injeção de 15 segundos. A análise dos dados foi realizada com o software GeneMarker (Soft Genetics, LLC; StateCollege, Pensilvânia, Estados Unidos).

### 3.6. Obtenção de amostras de tumores fixados em formalina e embebidos em parafina (FFPE)

Foram analisadas lâminas histológicas de tumor de 59 pacientes atendidos pelo Programa de Aconselhamento Genético, que realizaram enucleação a partir de 1997. Amostras de sangue de todos estes pacientes tinham sido previamente estudadas com sequenciamento de Sanger, não mostrando alterações do gene *RB1*. Em 48 destes pacientes, suas amostras de sangue tinham sido também analisadas por MLPA, confirmando-se a ausência de alterações do gene *RB1*. Nos outros 11 pacientes suas amostras de sangue foram analisadas por MLPA neste estudo, confirmando-se ausência de alterações do gene *RB1*.

As lâminas coradas com HE (Hematoxilina-Eosina) na Divisão de Patologia do INCA foram revisadas pelo patologista Dr. Paulo Faria para selecionar apenas um bloco por paciente, sendo escolhidos aqueles com maior área tumoral disponível.

Foram obtidos três cortes de dez micrômetros por bloco e encaminhados para o laboratório em tubos de 1,5ml.

### **3.7. Obtenção de amostras de retina normal**

Para controle das reações de MLPA que utilizavam DNA de amostras tumorais fixadas em parafina foram selecionados três blocos com retina normal proveniente de olhos saudáveis enucleados no INCA como consequência da retirada outros tumores e disponibilizados pelo Dr. Paulo Faria.

### **3.8. Isolamento de DNA das amostras tumorais e de retina normal**

O isolamento do DNA foi realizada em tubos de 1,5ml com os três cortes de 10 micrômetros de cada bloco de material parafinado tratados com 200µl da solução de lise (50 mmol/L Tris-HCl [pH 8,5], 100 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 0,5% Tween 20, e 0,5% NP40) descrita por Atanesyan e colaboradores (2017). Os tubos foram posteriormente submetidos à incubação a 90°C por 15 minutos no termobloco e mantidos em banho-maria a 55°C por 5 minutos. Em seguida, acrescentou-se 20µl de proteinase K (Invitrogen™, Carlsbad, Califórnia, Estados Unidos) a cada um dos tubos, que retornaram para incubação a 55°C, desta vez permanecendo por aproximadamente 12 a 14 horas. Após este período, a enzima foi inativada por aquecimento a 80°C por 10 minutos e, em seguida, os tubos foram centrifugados a 13.000rpm por 10 minutos permitindo o isolamento da fase incolor, que foi transferida para um novo tubo.

Para eliminar o SDS da solução de lise, para quantificar o DNA, e torná-lo mais estável para armazenamento, uma etapa adicional de purificação foi realizada com o kit PureLink™ PCR Purification (Invitrogen™), seguindo as mesmas instruções do fabricante para purificação de produtos de PCR, com alteração do volume tampão de eluição para 40µl.

### **3.9. Avaliação da qualidade das amostras de tumores FFPE**

Para avaliar a qualidade do DNA tumoral, 15/59 amostras escolhidas de forma aleatória foram submetidas à eletroforese na plataforma 2200 TapeStation (Agilent Technologies, Waldbronn, Karlsruhe, Alemanha). Esse equipamento fornece um

índice de integridade do DNA (DIN) que varia do 0 ao 10, sendo 10 indicativo de DNA de alta qualidade e com baixa fragmentação e 0 indicativo de DNA de baixa qualidade e com altos níveis de degradação.

Inicialmente, os reagentes do kit *Genomic DNA Reagents* (Agilent Technologies), tampão *Genomic DNA Sample Buffer* e o marcador de peso molecular *Genomic DNA Ladder*, foram mantidos em temperatura ambiente por 30 minutos e findado este tempo, os reagentes homogeneizados no vórtex. Foram preparadas misturas contendo, para cada amostra, 10µl do tampão Genomic DNA Sample Buffer e 1µl do DNA tumoral com concentração entre 10 – 100 ng/µl. Adicionalmente, outra mistura foi preparada com 10µl do tampão Genomic DNA Sample Buffer e 1µl do Genomic DNA Ladder. Os tubos contendo cada mistura foram homogeneizados no agitador recomendado pelo fabricante (IKA) a 2000rpm por 1 minuto. Seguidamente, foram posicionados na plataforma 2200 TapeStation e submetidos à eletroforese. Os resultados foram analisados no *software* TapeStation *Analysis*, para estimar o índice de integridade (DIN) de cada amostra.

### **3.10. Investigação de alterações em genes associados ao câncer**

Esta análise foi realizada nas com o painel NGHS-501X (Qiagen®, Germantown, Maryland, Estados Unidos), que abrange a região codificante e uma pequena parte dos íntrons de 160 genes (incluindo *RB1*) que se apresentam comumente mutados em diversos tipos de câncer (Tabela 3.2).

### **3.11. Seleção de amostras tumorais por PCR em tempo real (qPCR)**

Para avaliar quais amostras tumorais apresentavam a qualidade necessária para a análise com o painel de genes, foi utilizado o conjunto de reagentes *QIAseq™ DNA QuantiMIZE Assay* (Qiagen, Hilden, Alemanha) que estima o nível de fragmentação de cada amostra e a proporção de material amplificável a partir da eficiência de amplificação em reações de PCR em tempo real de duas regiões genômicas, uma de 100pb e outra de 200pb.

O DNA das 59 amostras tumorais selecionadas foi previamente diluído seguindo a proporção de 4µl de amostra para 28µl de água ultrapura. Duas combinações de reagentes para PCR foram preparadas contendo, para cada amostra, 21,45µl de água ultrapura, 41,25µl do GeneRead qPCR SYBR Green

Mastermix e 3,3µl dos iniciadores correspondentes (Assay 100 para a primeira e Assay 200 para a segunda combinação). Quinze microlitros de cada amostra foram adicionados a 60µl de cada uma das combinações, homogeneizados e então colocados em triplicatas nos poços das placas.

As placas com os reagentes e as amostras de DNA foram colocadas na plataforma ViiA™ 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) onde foram aquecidas a 95°C por 15 minutos seguidos de 16 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60° por um minuto. Os dados gerados foram ajustados com linha de base automática e CT (*Cycle Threshold*) variável para cada corrida, sendo o mesmo para ambas reações e o necessário para distinguir o sinal fluorescente de fundo (*background*) emitido durante os primeiros ciclos da PCR.

### **3.12. Análise dos resultados de qPCR**

Os valores de CT gerados foram exportados para uma planilha de análise de dados disponibilizada pelo fabricante do kit QIAseq™ DNA QuantIMIZE Assay (Qiagen). Foram excluídas da análise com o painel as amostras sinalizadas pela planilha como não recomendadas (*"We do not recommend proceeding with this sample"*). Adicionalmente, para as amostras selecionadas, a planilha informava a faixa de concentração de cada amostra a ser usada na etapa de enriquecimento do painel e, quando necessário, o número de ciclos adicionais.

Esta análise selecionou amostras tumorais de 23/59 pacientes sendo: quatro com tumor bilateral e 19 com tumor unilateral. Uma amostra que não havia passado no teste (T32) foi adicionada para comparação do resultado.

Junto às amostras tumorais selecionadas foram incluídas amostras pareadas de DNA de sangue para uma posterior análise com o painel de 160 genes.

Tabela 3.2: Lista dos 160 genes analisados no presente estudo.

<i>ABL1</i>	<i>BUB1B</i>	<i>DDR2</i>	<i>FGFR2</i>	<i>IDH2</i>	<i>MEN1</i>	<i>PDGFRA</i>	<i>SMARCA4</i>
<i>AKT1</i>	<i>CARD11</i>	<i>DICER1</i>	<i>FGFR3</i>	<i>IKZF1</i>	<i>MET</i>	<i>PHF6</i>	<i>SMARCB1</i>
<i>AKT2</i>	<i>CBL</i>	<i>DNMT3A</i>	<i>FH</i>	<i>IL6ST</i>	<i>MLH1</i>	<i>PIK3CA</i>	<i>SMO</i>
<i>ALK</i>	<i>CBLB</i>	<i>ECT2L</i>	<i>FLCN</i>	<i>IL7R</i>	<i>MSH2</i>	<i>PIK3R1</i>	<i>SPOP</i>
<i>AMER1</i>	<i>CD79A</i>	<i>EGFR</i>	<i>FLT3</i>	<i>JAK1</i>	<i>MSH6</i>	<i>PMS2</i>	<i>SRC</i>
<i>APC</i>	<i>CD79B</i>	<i>EP300</i>	<i>FUBP1</i>	<i>JAK2</i>	<i>MTOR</i>	<i>PPP2R1A</i>	<i>STK11</i>
<i>AR</i>	<i>CDC73</i>	<i>EPCAM</i>	<i>GATA1</i>	<i>JAK3</i>	<i>MUTYH</i>	<i>PRDM1</i>	<i>SUFU</i>
<i>ARID1A</i>	<i>CDH1</i>	<i>ERBB2</i>	<i>GATA2</i>	<i>KDM6A</i>	<i>MYC</i>	<i>PRKAR1A</i>	<i>TERT</i>
<i>ARID2</i>	<i>CDK12</i>	<i>ERBB3</i>	<i>GATA3</i>	<i>KDR</i>	<i>MYD88</i>	<i>PTCH1</i>	<i>TNFAIP3</i>
<i>ASXL1</i>	<i>CDK4</i>	<i>ERBB4</i>	<i>GNA11</i>	<i>KIT</i>	<i>NF1</i>	<i>PTEN</i>	<i>TNFRSF14</i>
<i>ATM</i>	<i>CDKN2A</i>	<i>ERCC5</i>	<i>GNAQ</i>	<i>KLF6</i>	<i>NF2</i>	<i>PTPN11</i>	<i>TP53</i>
<i>ATRX</i>	<i>CHEK2</i>	<i>ESR1</i>	<i>GNAS</i>	<i>KMT2D</i>	<i>NFE2L2</i>	<i>RAC1</i>	<i>TSC1</i>
<i>BAP1</i>	<i>CIC</i>	<i>EZH2</i>	<i>GPC3</i>	<i>KRAS</i>	<i>NFKBIA</i>	<i>RB1</i>	<i>TSC2</i>
<i>BCL6</i>	<i>CREBBP</i>	<i>FAM46C</i>	<i>GRIN2A</i>	<i>MAP2K1</i>	<i>NOTCH1</i>	<i>RET</i>	<i>TSHR</i>
<i>BCOR</i>	<i>CRLF2</i>	<i>FANCA</i>	<i>H3F3A</i>	<i>MAP2K2</i>	<i>NOTCH2</i>	<i>ROS1</i>	<i>U2AF1</i>
<i>BRAF</i>	<i>CSF1R</i>	<i>FANCD2</i>	<i>HIST1H3B</i>	<i>MAP2K4</i>	<i>NPM1</i>	<i>SDHB</i>	<i>VHL</i>
<i>BRCA1</i>	<i>CTNNB1</i>	<i>FANCE</i>	<i>HNF1A</i>	<i>MAP3K1</i>	<i>NRAS</i>	<i>SETD2</i>	<i>WT1</i>
<i>BRCA2</i>	<i>CYLD</i>	<i>FAS</i>	<i>HRAS</i>	<i>MAP4K3</i>	<i>PALB2</i>	<i>SF3B1</i>	<i>XPC</i>
<i>BRIP1</i>	<i>DAXX</i>	<i>FBXO11</i>	<i>HSPH1</i>	<i>MDM2</i>	<i>PAX5</i>	<i>SLC7A8</i>	<i>ZNF2</i>
<i>BTK</i>	<i>DDB2</i>	<i>FBXW7</i>	<i>IDH1</i>	<i>MED12</i>	<i>PBRM1</i>	<i>SMAD4</i>	<i>ZRSR2</i>

### **3.13. Enriquecimento por PCR multiplex e preparo das amostras pareadas**

Cada amostra de DNA foi inicialmente quantificada no fluorômetro Qubit® (Thermo Scientific). As amostras de DNA de sangue foram diluídas até concentração final de 2,5ng/μl enquanto que as amostras de DNA tumoral foram diluídas a concentrações variadas de acordo com a análise dos dados de PCR em tempo real feita com o kit *QIAseq DNA QuantIMIZE Assay* (Qiagen®).

O conjunto de reagentes NGHS-501X (Qiagen®) foi utilizado de acordo com as instruções do protocolo GeneRead DNAseq Targeted Panels V2 (Qiagen®). Quatro reações de PCR multiplex, cada uma contendo um dos quatro conjuntos de iniciadores (A1 - A4) disponíveis no kit foram realizadas para cada amostra. Cada uma das quatro reações continha 4,4μl de tampão GeneRead DNAseq Panel PCR Buffer (5x), 11μl de um conjunto de iniciadores, 1,5μl da enzima GeneRead HotStar Taq DNA Polymerase (6 U/μl), 0,7μl de água *Dnase-free* e 4μl da amostra diluída previamente. As reações foram colocadas em um termociclador e submetidas a 95°C por 15 minutos, 16 ciclos de 95°C por 20 segundos e 60°C por 8 minutos, 72°C por 10 minutos e incubação a 4°C. Em alguns casos, seis ciclos foram acrescentados para compensar a menor eficiência esperada para as amostras tumorais devido à fragmentação.

Posteriormente, os produtos das quatro reações de cada amostra foram combinados em um único tubo e purificados com esferas magnéticas Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, Pasadena, Califórnia, Estados Unidos) de acordo com as proporções recomendadas, eluídas em 28μl de tampão de eluição e seguidamente, quantificados por fluorometria com Qubit®.

Para conferir se os fragmentos obtidos após o enriquecimento estavam dentro da faixa esperada (cerca de 160pb), foi realizada eletroforese em géis de agarose a 2% com 3μl de cada produto purificado e 1μl do GelRed® (Biotium Inc., Fremont, Califórnia, Estados Unidos), utilizando 2,5μl do marcador de peso molecular 50bp DNA Ladder (Invitrogen™) e 1μl do GelRed®.

### **3.14. Preparo das bibliotecas para sequenciamento de nova geração (NGS)**

O preparo de cada uma das 48 bibliotecas foi realizado em apenas uma etapa com o kit *QIAseq 1-Step Amplicon Library* (Qiagen®) de acordo com as instruções do

fabricante. Utilizou-se 100ng de cada produto purificado, exceto para cinco produtos com baixa concentração que foram totalmente utilizados. Uma única reação no termociclador a 20°C por 30 minutos preparou simultaneamente os produtos da amplificação para ligação e realizou a ligação com os adaptadores as extremidades dos fragmentos de DNA. O excesso de adaptadores, oligonucleotídeos (iniciadores) e outros componentes foram removidos com esferas magnéticas Agencourt® AMPure® XP (Beckman Coulter). Seguidamente, as bibliotecas foram quantificadas com o fluorômetro Qubit®. Os dados desta quantificação indicaram a necessidade de uma etapa opcional de enriquecimento que foi realizada com oligonucleotídeos providos pelo mesmo kit (*QIAseq 1-Step Amplicon Library*) que hibridizam com os adaptadores previamente adicionados a esses fragmentos. Esta reação foi feita com DNA polimerase de alta fidelidade contida no kit e condições otimizadas de tamponamento que asseguraram taxas de erro extremamente baixas. Os produtos foram novamente purificados com esferas magnéticas, quantificados no Qubit® e submetidos a eletroforese em géis de agarose a 2% com 3µl de cada produto purificado e 1µl do GelRed® (Biotium Inc., Fremont, Califórnia, Estados Unidos), utilizando 2,5µl do marcador de peso molecular 50bp DNA Ladder (Invitrogen™) e 1µl do GelRed® para conferir o tamanho esperado (280pb).

Quatorze bibliotecas, preferencialmente de amostras tumorais, onde uma maior variação era esperada, foram selecionadas para confirmar o tamanho previamente encontrado com uma maior precisão que a da eletroforese em gel de agarose. Duas bibliotecas de sangue e 12 de tumor foram analisadas através do sistema Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, Califórnia, Estados Unidos) conforme instruções de uso do kit Agilent DNA 1000.

### **3.15. Diluição das bibliotecas**

Inicialmente, a concentração de cada biblioteca foi convertida de ng/µl para nanomolar (nM) através do seguinte cálculo:

$$[c] = \left( \frac{[C]}{660 \times 280} \right) \times 10^6$$

Onde **[c]** é a concentração em nM, **[C]** a concentração em ng/μl, **660** uma constante e **280** o tamanho predominante dos fragmentos, em pares de base. Realizada a conversão, 3μl de cada biblioteca foram diluídos para uma concentração final de 2nM em tampão de eluição.

### 3.16. Clusterização

Uma mistura com as 24 bibliotecas de DNA de sangue e outra mistura com as 24 bibliotecas de DNA de tumor foram preparadas com 2μl de cada biblioteca a 2nM. Dez microlitros de cada mistura foram tratados com 10μl de NaOH a 0,1N preparado no momento, homogeneizados no vórtex e incubados a temperatura ambiente por cinco minutos para que houvesse denaturação. Posteriormente, foram adicionados a cada mistura, 980μl do tampão HT1 contido no kit HiSeq® Rapid PE Cluster Kit v2 (Illumina Inc., San Diego, Califórnia, Estados Unidos), para neutralizar o NaOH, seguidamente as misturas foram diluídas em tampão HT1. A mistura correspondente ao *lane 1*, com as 24 bibliotecas de DNA de sangue, foi ajustada para uma concentração final de 11pmol. A mistura correspondente ao *lane 2*, com as bibliotecas de DNA tumoral, foi ajustada para uma concentração final de 10pmol. As misturas foram colocadas na plataforma cBot, onde a hibridização na *flowcell* e a primeira extensão do processo de geração de *cluster* foi realizado com o conjunto de reagentes HiSeq® Rapid PE Cluster Kit v2 (Illumina) e o programa RR\_TemplateHyb\_FirstExt\_VR. A *flowcell* contendo as amostras foi destinada a plataforma HiSeq2500 (Illumina) onde a clusterização foi finalizada com os reagentes do kit HiSeq® Rapid PE Cluster Kit v2 (Illumina).

### 3.17. Corrida de Sequenciamento na plataforma Illumina HiSeq 2500

A corrida na plataforma HiSeq 2500 ocorreu no modo “*Rapid*” com os reagentes do kit HiSeq® Rapid SBS Kit v2 (Illumina), seguindo as instruções do fabricante. Foram realizados 218 ciclos: duas leituras de 101 nucleotídeos pertencentes aos fragmentos de interesse e duas leituras dos oito nucleotídeos correspondentes aos índices. Os dados brutos gerados pela plataforma Illumina HiSeq 2500 foram processados pela bioinformata Dr. Nicole Scherer para gerar arquivos no formato FASTQ por biblioteca. As amostras de DNA de sangue e tumor

de cada paciente foram nomeadas, respectivamente, com as letras “S” e “T” acompanhadas pelo código de identificação do paciente.

### 3.18. Análise dos dados

#### 3.18.1 Seleção de variáveis de alta confiabilidade

Os arquivos FASTQ foram colocados na plataforma *online* GeneGlobe (Qiagen), onde os dados foram depurados, resultando em uma tabela de variantes (em Variant Call Format - VCF) e ainda, para as amostras tumorais, dados sobre variação do número de cópias (CNV).

A confiabilidade dos dados foi testada para descartar falsas variantes devido a problemas técnicos (erros de amplificação, leitura, etc) mediante os critérios para excluir variantes de baixa confiabilidade baseados em:

- Rejeição de leituras com BPI (*barcode-level prediction index*) menor que quatro, evitando falsos positivos causados pelo *barcode*.
- Rejeição de variantes em *loci* onde mais de 40% das leituras apresentaram-se inferiores a Q20 (Phred quality score de identificar uma base errada com probabilidade de 1/100 bases ou seja com acuracia de 99%).
- Rejeição de variantes observadas apenas ou principalmente em uma única fita.
- Rejeição de variantes localizadas ou rodeadas por sequências homopoliméricas de 10 bases ou localizadas em regiões de microssatélites.
- Rejeição de variantes em regiões de baixa complexidade, ou seja, em sequências de 20 bases formadas por apenas dois tipos de nucleotídeos.
- Rejeição de variantes localizadas nas 20 bases das extremidades das leituras ou nas duas bases adjacentes ao oligonucleotídeo utilizado para sequenciamento.

#### 3.18.2 Classificação das variantes

Inicialmente foram consideradas as predições de impacto listadas na coluna SnpEff da tabela de variantes previamente gerada. Aquelas consideradas de alto impacto foram diretamente analisadas pela plataforma online VarSome (The Human Genomics Community; <https://VarSome.com/>), sendo classificadas segundo os critérios do *American Colleague of Medical Genetics and Genomics* (ACMG) descritos

nas Tabelas 3.3 e 3.4 (RICHARDS *et al.*, 2015) . No VarSome também foi consultado o significado clínico da variante reportado no ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>), um arquivo público que relaciona variantes humanas e fenótipos através de dados de testes clínicos, pesquisas ou da literatura.

Tabela 3.3: Definição dos critérios utilizados para classificação de variantes benignas

Evidência de impacto benigno	Sigla	Definição
Satisfatória (stand alone)	BA1	Frequência alélica > 5% nos dados do <i>Exome Sequencing</i> , <i>1000 Genomes</i> , <i>gnomAD</i> ou <i>Exome Aggregation Consortium</i>
Forte	BS1	Frequência alélica maior que o esperado para a desordem
	BS2	Variante observada em um indivíduo adulto saudável para um distúrbio recessivo (em homozigose), dominante (em heterozigose) ou ligado ao cromossomo X (em hemizigose) com penetrância total esperada em idade precoce
	BS3	Estudos funcionais <i>in vitro</i> ou <i>in vivo</i> bem estabelecidos não mostraram nenhum efeito prejudicial na função da proteína ou no splicing
	BS4	Sem segregação em membros afetados de uma família
Favorável (supporting)	BP1	Variante <i>missense</i> em um gene no qual variantes que geram proteínas truncadas são conhecidas por causar doença
	BP2	Observado em trans com uma variante patogênica para um gene / distúrbio dominante totalmente penetrante ou observado em cis com uma variante patogênica em qualquer padrão de herança
	BP3	Deleções ou inserções em moldura de leitura em uma região repetitiva sem função conhecida
	BP4	Múltiplas evidências computacionais não sugerem impacto no gene ou no produto gênico (conservação, evolução, impacto no splicing, etc.)
	BP5	Variante encontrada em um caso com etiologia alternada da doença
	BP6	Relatada recentemente como benigna por uma fonte confiável, mas não disponível para realização de uma avaliação independente
	BP7	Variante sinônima (silenciosa) para a qual os algoritmos de predição de <i>splicing</i> não preveem impacto na sequência consenso e nem a criação de um novo sítio de <i>splicing</i> e o nucleotídeo não é altamente conservado

Tabela 3.4: – Definição dos critérios utilizados para classificação de variantes patogênicas

Evidência de patogenicidade	Sigla	Definição
Muito forte	PVS1	Variante nula — <i>nonsense</i> , <i>frameshift</i> , sítios de splicing canônicos ( $\pm 1$ ou $\pm 2$ ), códon de iniciação, deleção de um ou múltiplos exons— em um gene onde a perda de função (LOF) é um mecanismo conhecido da doença
Forte	PS1	Mesma alteração de aminoácidos que uma variante patogênica previamente estabelecida, independentemente da alteração de nucleotídeos
	PS2	<i>De novo</i> (com confirmação nos pais) em um paciente com a doença e sem história familiar
	PS3	Estudos funcionais <i>in vitro</i> ou <i>in vivo</i> bem estabelecidos, que apoiam um efeito prejudicial sobre o gene ou produto gênico
	PS4	A prevalência da variante nos indivíduos afetados é significativamente maior em comparação com a prevalência nos controles
Moderada	PM1	Localizado em um <i>hotspot</i> mutacional e/ou em domínio funcional crítico e bem estabelecido (por exemplo, sítio ativo de uma enzima)
	PM2	Ausente em controles (ou em baixíssima frequência se recessivo) nos projetos <i>Exome Sequencing</i> , <i>1000 Genomes</i> , <i>gnomAD</i> ou <i>Exome Aggregation Consortium</i>
	PM3	Para distúrbios recessivos, detectadas em <i>trans</i> com uma variante patogênica
	PM4	O comprimento da proteína muda como resultado de deleções ou inserções <i>in frame</i> em uma região sem repetição ou variantes que geram perda do códon de parada
	PM5	Variante <i>missense</i> em um resíduo de aminoácido onde uma variante <i>missense</i> diferente, determinada como patogênica, foi encontrada anteriormente
	PM6	Definida como <i>de novo</i> , mas sem confirmação nos pais
Favorável (supporting)	PP1	Co-segregação com doença em múltiplos membros da família afetados em um gene definitivamente conhecido por causar esta doença
	PP2	Variante <i>missense</i> em um gene que possui uma baixa taxa de variantes <i>missense</i> benignas e que variantes <i>missense</i> são um mecanismo comum de doença
	PP3	Múltiplas evidências computacionais suportam um efeito deletério no gene ou produto gênico (conservação, evolução, impacto no <i>splicing</i> , etc.)
	PP4	O fenótipo ou história familiar do paciente é altamente específico de uma doença com uma única etiologia genética
	PP5	Relatada recentemente como patogênica por uma fonte confiável, mas não disponível para realizar uma avaliação independente

De acordo com os critérios da ACMG, as variantes foram classificadas em cinco classes:

Benigna (classe 1), quando algum dos conjuntos de critérios for atendido:

- um satisfatório (BA1)
- dois ou mais com forte evidência de impacto benigno (BS1–BS4)

Provavelmente Benigna (classe 2), quando algum dos conjuntos de critérios for atendido:

- um com forte evidência de impacto benigno (BS1–BS4) e um de suporte (BP1–BP7)
- dois ou mais de suporte (BP1–BP7)

Variante de Significado Incerto – VUS (classe 3) quando nenhum critério para classificação nas outras classes for atendido ou quando a combinação dos critérios benignos e patogênicos for contraditória.

Provavelmente Patogênica (classe 4), quando algum dos conjuntos de critérios for atendido:

- um com evidência de patogenicidade muito forte (PVS1) e um moderado (PM1–PM6)
- um com evidência de patogenicidade forte (PS1–PS4) e um ou dois moderados (PM1–PM6)
- um com evidência de patogenicidade forte (PS1–PS4) e dois ou mais de suporte (PP1–PP5)
- três ou mais com evidência de patogenicidade moderada (PM1–PM6)
- dois com evidência de patogenicidade moderada (PM1–PM6) e dois ou mais de suporte (PP1–PP5)
- um moderado (PM1–PM6) e quatro ou mais de suporte (PP1–PP5).

Patogênica (classe 5), quando algum dos conjuntos de critérios for atendido:

- um com evidência de patogenicidade muito forte (PVS1) e: um forte ou mais (PS1–PS4), ou dois ou mais moderados (PM1–PM6), ou um moderado (PM1–PM6) e um suporte (PP1–PP5), ou dois ou mais de suporte (PP1–PP5)

- dois ou mais com evidência de patogenicidade forte (PS1–PS4)
- um com forte evidência de patogenicidade (PS1–PS4) e: três ou mais moderados (PM1–PM6), ou dois moderados (PM1–PM6) e dois ou mais de suporte (PP1–PP5), ou um moderado (PM1–PM6) e quatro de suporte (PP1–PP5)

As variantes que foram classificadas pela análise na plataforma GeneGlobe com impactos baixos, moderados ou modificadores, foram primeiramente analisadas através da plataforma *online The Ensembl Variant Effect Predictor* (VEP - [http://grch37.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Tools/VEP](http://grch37.ensembl.org/Homo_sapiens/Tools/VEP)) que descartou aquelas variantes com frequência superior a 1% nos bancos de dados populacionais do projeto 1000 *Genomes*. Das restantes, foram também descartadas as sinônimas, intrônicas e localizadas nas extremidades 3' ou 5' das regiões terminais não traduzidas (UTR) que, geralmente, oferecem um menor risco de patogenicidade, sendo mantidas apenas as *missense*, em sítio de splicing, geradoras de *stop codon*, e deleções com conservação da moldura de leitura. As variantes restantes foram analisadas pela plataforma VarSome e classificadas de forma semelhante ao primeiro grupo.

Exclusivamente para as variantes do gene *RB1*, após a sua classificação segundo os critérios da ACMG na plataforma VarSome, as definidas com significado incerto (VUS) foram pesquisadas na plataforma *online Leiden Open Variation Database* (LOVD – FOKKEMA *et al.*, 2011 - <http://RB1-lovd.d-lohmann.de>). Posteriormente foram analisadas na plataforma *online Human Splice Finder* (HSF - DESMET *et al.*, 2009 - <http://www.umd.be/HSF3/HSF.shtml>), que visa avaliar o impacto no splicing. Variantes com profundidade de cobertura inferior a 50X foram dispensadas das análises posteriores, exceto aquelas encontradas também nas amostras pareadas de sangue.

### **3.19. Sequenciamento de Sanger para validação de variantes constitutivas no *RB1***

Para validar as duas variantes constitutivas encontradas no gene *RB1* em amostras de sangue, as regiões em que estavam localizadas (exon 8 e íntron 20) foram amplificadas através de PCR com o uso dos iniciadores utilizados na rotina do Programa de Aconselhamento Genético cujas sequências encontram-se na Tabela 3.55.

Variante	Amostra	Posição	Sequência (5'-3')	Tamanho do produto	Referência
c.763C>T	S80	8F	GAATGTTACCAAGATTATTTTGGACC	376	Barbosa <i>et al.</i> , 2013
		8R	TGCTACTGCAAAAGAGTTAGCAC		
c.1960+1G>T	S03	19F	ATCTGTGATTCTTAGCCAACCTG	250	Braggio <i>et al.</i> , 2004
		19R	AGTCAGCCTAGTTTCAGAGTC		

Tabela 3.5: Iniciadores utilizados para amplificação do exon 8 e intron 20 do *RB1*.

A PCR foi realizada com polimerase de alta fidelidade para evitar possíveis erros detecção de SNPs devido a menor fidelidade da polimerase recombinante. Ambas as reações foram realizadas utilizando-se 2,5µl do tampão 10X *High Fidelity PCR Buffer* (Thermo Scientific), 1µl da solução de MgSO<sub>4</sub> 50mM (Thermo Scientific), 0,25µl de dNTP *mix* (20mM), 1,4µl de cada um dos dois iniciadores a 100pmol (senso ou anti-senso), 0,1µl da enzima *Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Thermo Scientific) e 1µl do DNA de sangue periférico (~50ng). Os volumes das reações foram ajustados para 25µl com água ultrapura. As soluções foram colocadas no termociclador em tubos de 0,2ml e submetidas a incubação a 94°C por 2 minutos, seguida de 10 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos (com redução de 1°C a cada ciclo) e 68°C por 1 minuto/30 segundos e 25 ciclos de 94°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos e 68°C por 1 minuto com incubação final a 68°C por 30 segundos. Os produtos da amplificação foram armazenados a 4°C até a montagem da placa para sequenciamento.

As reações de sequenciamento, com um volume final de 10 microlitros, foram preparadas em uma placa utilizando-se o kit *Big Dye Terminator v3.1* (Applied Biosystems), contendo, para cada reação: 3,5µl dos iniciadores senso ou anti-senso a 1pmol, 1µl do *BigDye™ Terminator 3.1 Ready Reaction Mix*, 1,5µl do tampão *BigDye™ Terminator 5X Sequencing Buffer* e 4µl de cada produto da amplificação. A placa foi colocada no termociclador onde a reação de sequenciamento foi realizada com incubação a 96°C por 1 minuto, seguida de 25 ciclos de 96°C por 15 segundos, 50°C por 15 segundos e 60°C por 4 minutos. A corrida e leitura do sequenciamento ocorreram na plataforma ABI-3130XL GeneticAnalyzer (Applied Biosystems). As sequencias geradas foram exportadas para o *software* ChromasPro (Technelysium Pty Ltd, Brisbane, Queensland, Austrália), onde os eletroferogramas foram analisados.

### **3.20. Análise da variação do número de cópias (CNV) dos genes do painel**

Estimativas do número de cópias foram fornecidas pela plataforma *online* GeneGlobe (Qiagen) após comparações entre amostras de DNA de sangue e tumor apenas com dados com valores superiores Q25. Na tabela gerada foram estimados três valores de CNV para cada gene (mínimo, máximo e estimativa de número de cópias). Quando os dados desta tabela foram comparados com os dados de MLPA os valores máximos foram utilizados como estimativa de CNV. Uma amostra (T58) não gerou resultados para esta análise.

#### **3.20.1 MLPA em amostras tumorais para validação de dados de CNV**

As reações de MLPA foram realizadas com o protocolo anteriormente descrito. Inicialmente, confiabilidade da técnica de MLPA para análise de amostras tumorais em parafina foi testada utilizando-se amostras pareadas de um paciente. Uma vez confirmada a confiabilidade do MLPA para analisar amostras tumorais, o MLPA foi utilizado para validar resultados de NGS de 10 amostras tumorais (ver fluxograma, Figura 3.1).

A análise de CNV a partir do painel de genes adota o número 2 como valor esperado de cópias para o genoma diploide normal, já o MLPA considera cada cópia com valor de 0,5. Para considerar intervalos semelhantes de valores entre as duas metodologias, foram estipuladas como deleções resultados do painel com valores inferiores a 1,4 (correspondendo a 0,7 pelo MLPA), e como amplificação valores acima de 2,6 (correspondendo a 1,30 pelo MLPA). O número normal de cópias considerado foi aquele entre os intervalos: 1,4-2,6 para o painel e 0,7-1,30 para MLPA.

### **3.21. Análise de associação entre alterações somáticas e características clinico-patológicas**

As amostras tumorais foram divididas em dois grupos de acordo a presença ou ausência de mutações patogênicas (incluindo deleções completas) no gene *RB1*. As amostras consideradas sem alterações patogênicas foram aquelas com cobertura satisfatória de > 95% da região codificante do gene *RB1*.

Inicialmente foram comparadas características como sexo, lateralidade do tumor, primeiro sintoma, origem da mutação (constitutiva ou somática), tipo de mutação (missense, nonsense, etc) e idade no diagnóstico entre grupos com ou sem mutações em *RB1*. Para as variáveis categóricas, foi usado o método exato de Fisher e, para a idade no diagnóstico foi utilizado o teste de comparação de médias. Ambas as análises foram realizados com o *software* MedCalc.

Posteriormente, o teste de  $\chi^2$  e teste exato de Fisher foram utilizados para comparar o número de tumores com mutações patogênicas nos 159 genes do painel com (1) presença de mutações patogênicas (incluindo deleções completas) no gene *RB1* e (2) lateralidade do tumor. Em seguida, o teste de  $\chi^2$  foi utilizado para analisar o número de mutações nos 159 genes do painel em relação às mesmas variáveis (presença de mutações patogênicas no *RB1* e lateralidade do tumor).

Para análise cada um dos 159 genes do painel, as frequências de mutações patogênicas foram calculadas pela razão entre o número de mutações identificadas e número de áreas informativas analisadas (Figura 3.2). As áreas informativas equivalem às regiões gênicas onde as mutações foram encontradas com profundidade de cobertura satisfatória, definida através da análise na plataforma *online* "Table Browser" do Genome Browser (<https://genome.ucsc.edu/index.html>).

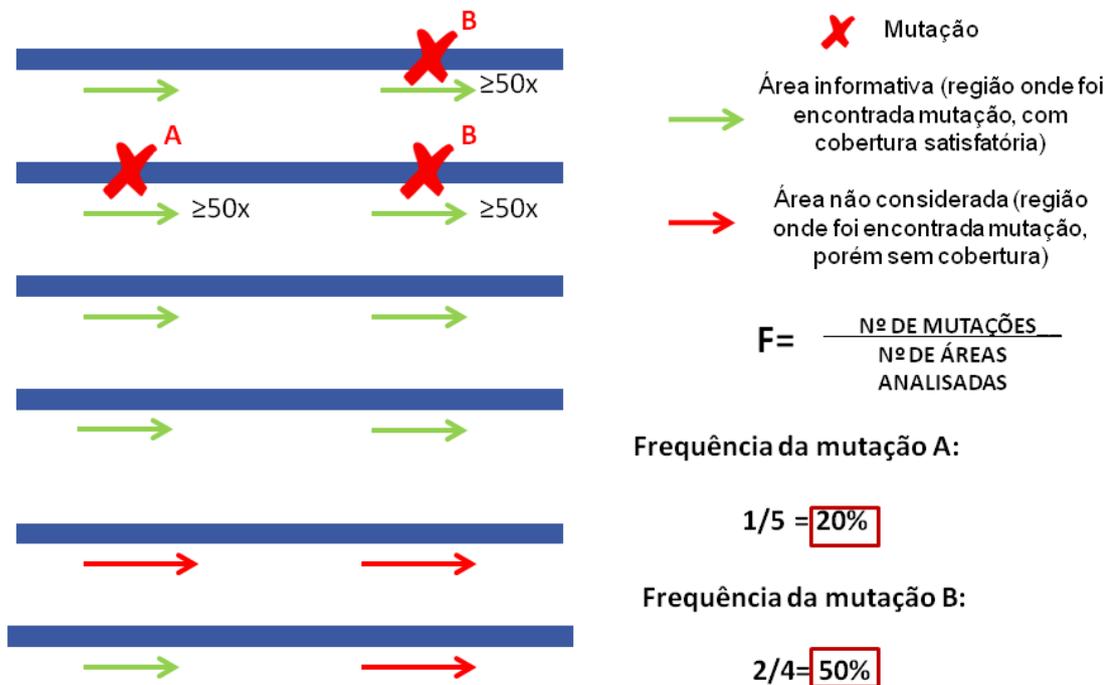


Figura 3.2: Método para cálculo das frequências de mutações patogênicas.

No grupo de amostras com mutações patogênicas nos 159 genes do painel, foram testadas, através do teste de comparação de proporções ( $\chi^2$ "N-1") com o software MEDCALC ([https://www.medcalc.org/calc/comparison\\_of\\_proportions.php](https://www.medcalc.org/calc/comparison_of_proportions.php)), associações entre: (1) frequência de mutações patogênicas em cada gene e presença de mutações patogênicas no *RB1*, e (2) frequência de mutações patogênicas em cada gene e lateralidade do tumor. Foram considerados significativos valores de  $p < 0,05$ .

Os genes que apresentaram mutações patogênicas foram analisados através da plataforma "Reactome" (FABREGAT *et al.*, 2018; <https://Reactome.org/>), que destacou as principais vias biológicas em que estes participam, e foram submetidos a novas análises de associação, desta vez entre frequência de mutações patogênicas em cada via e (1) presença de alterações patogênicas no *RB1*, e (2) lateralidade do tumor. De forma semelhante a análise citada anteriormente, foi utilizado o teste de comparação de proporções ( $\chi^2$ "N-1") com MEDCALC ([https://www.medcalc.org/calc/comparison\\_of\\_proportions.php](https://www.medcalc.org/calc/comparison_of_proportions.php)), considerando significativos os valores de  $p < 0,05$ . (DIMARAS *et al.*, 2015)

A frequência de ampliações e deleções para cada gene foi calculada através da razão entre o número de CNV e número de tumores analisados para o mesmo gene. Foram testadas possíveis associações entre frequência de ganhos (amplificações) ou deleções em cada gene e: (1) presença de alterações patogênicas em *RB1* e (2) lateralidade do tumor. Para isto, foi utilizado o teste de comparação de proporções ( $\chi^2$ "N-1") com MEDCALC ([https://www.medcalc.org/calc/comparison\\_of\\_proportions.php](https://www.medcalc.org/calc/comparison_of_proportions.php)), considerando significativos valores de  $p < 0,05$ . Os genes que apresentaram amplificação mais frequentemente em um grupo (com ou sem mutação no *RB1*, unilateral vs bilateral) também foram analisados através da plataforma Reactome.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. MLPA em sangue periférico

Buscando identificar alterações constitutivas no gene *RB1* foram analisadas amostras de sangue de pacientes que não apresentaram mutações patogênicas no sequenciamento de Sanger. Do total de 61 pacientes analisados, quatro mostraram alterações, três com tumor bilateral e um com tumor unilateral. Foram elas: deleção do exon 1 do *RB1*, deleção do exon 3 do gene *RB1* e duas deleções completas do gene *RB1*. Como o objetivo da análise pelo painel de genes era investigar pacientes sem alterações no *RB1* em amostras de sangue previamente analisadas, os quatro pacientes que apresentaram deleções por MLPA foram excluídos das análises posteriores.

#### 4.1.1 Descrição de casos

##### 4.1.1.1 Paciente nº 30

Paciente do sexo feminino, encaminhada ao ambulatório de Oncogenética do INCA por história pessoal de retinoblastoma bilateral. A paciente era a segunda filha de casal não consanguíneo com tumor diagnosticado em ambos os olhos aos 24 meses. O exame físico morfológico não demonstrou malformações maiores e o exame neurológico não constatou atraso do desenvolvimento. Embora o histórico familiar incluísse outros casos de neoplasias, como duas tias-avós paternas com leucemia e tataravó materna com câncer em local desconhecido diagnosticado acima dos 50 anos, não houve relatos de neoplasias oculares, crianças com atraso de desenvolvimento/deficiência intelectual ou síndromes malformativas (Figura 4.1A). Os pais analisados por MLPA não apresentaram a alteração encontrada na paciente.

Como mostra a Figura 4.1, a paciente apresentou deleção em heterozigose do exon 3 do gene *RB1*.

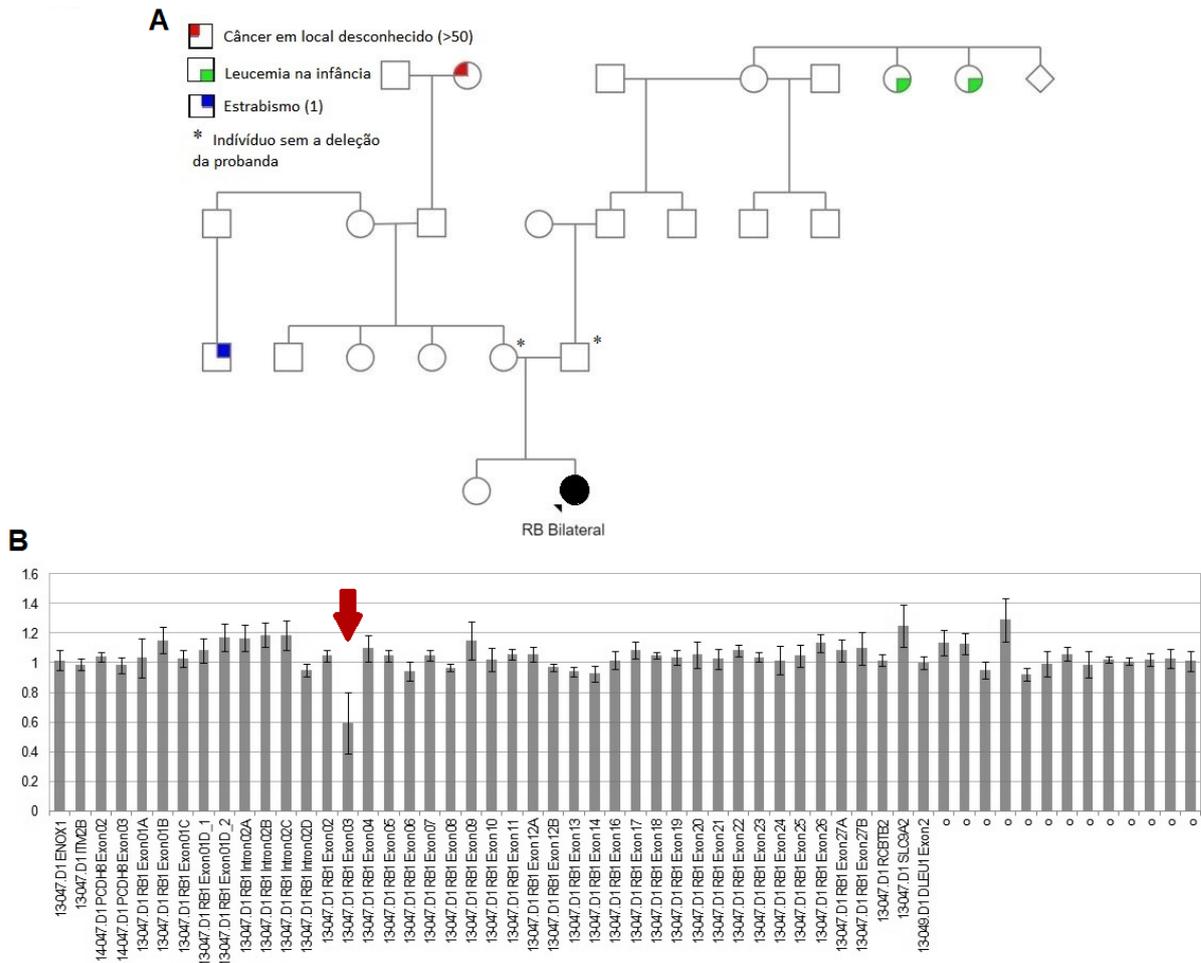


Figura 4.1: (A) Heredograma da família e (B) MLPA da paciente nº 30. No gráfico de MLPA cada alelo é representado por 0,5 no eixo Y e o símbolo “o” indica as sondas controles. A seta vermelha indica o exon 3, que apresentou deleção em heterozigose.

#### 4.1.1.2 Paciente nº 92

Paciente do sexo masculino, filho de casal não consanguíneo, foi encaminhado ao ambulatório de Oncogenética do INCA por história pessoal de retinoblastoma unilateral à direita diagnosticado com 25 meses. O histórico familiar constatou dois irmãos da mãe com sindactilia cutânea de 4/5 pododáctilos, irmã da mãe com suspeita de câncer de útero e tataravô paterno com câncer na garganta (Figura 4.2A). No exame físico morfológico, o paciente apresentou sindactilia cutânea dos 4/5 pododáctilos e assimetria facial. No exame neurológico constatou-se atraso psicomotor acentuado.

Como mostra a Figura 4.2B, apesar de apenas parte das sondas do *RB1* e genes adjacentes (*ENOX 1*, *ITM2B*, *PCDH8*, *RCBTB2* e *DLEU1*) apresentarem

valores indicando deleção (inferiores a 0,7), o resultado da MLPA indicou fortemente uma deleção completa em heterozigose considerando a posição das sondas de *RB1* em relação às sondas controles. O atraso psicomotor do probando também reforçou o resultado sugerido por ser característico de pacientes portadores dessa deleção.

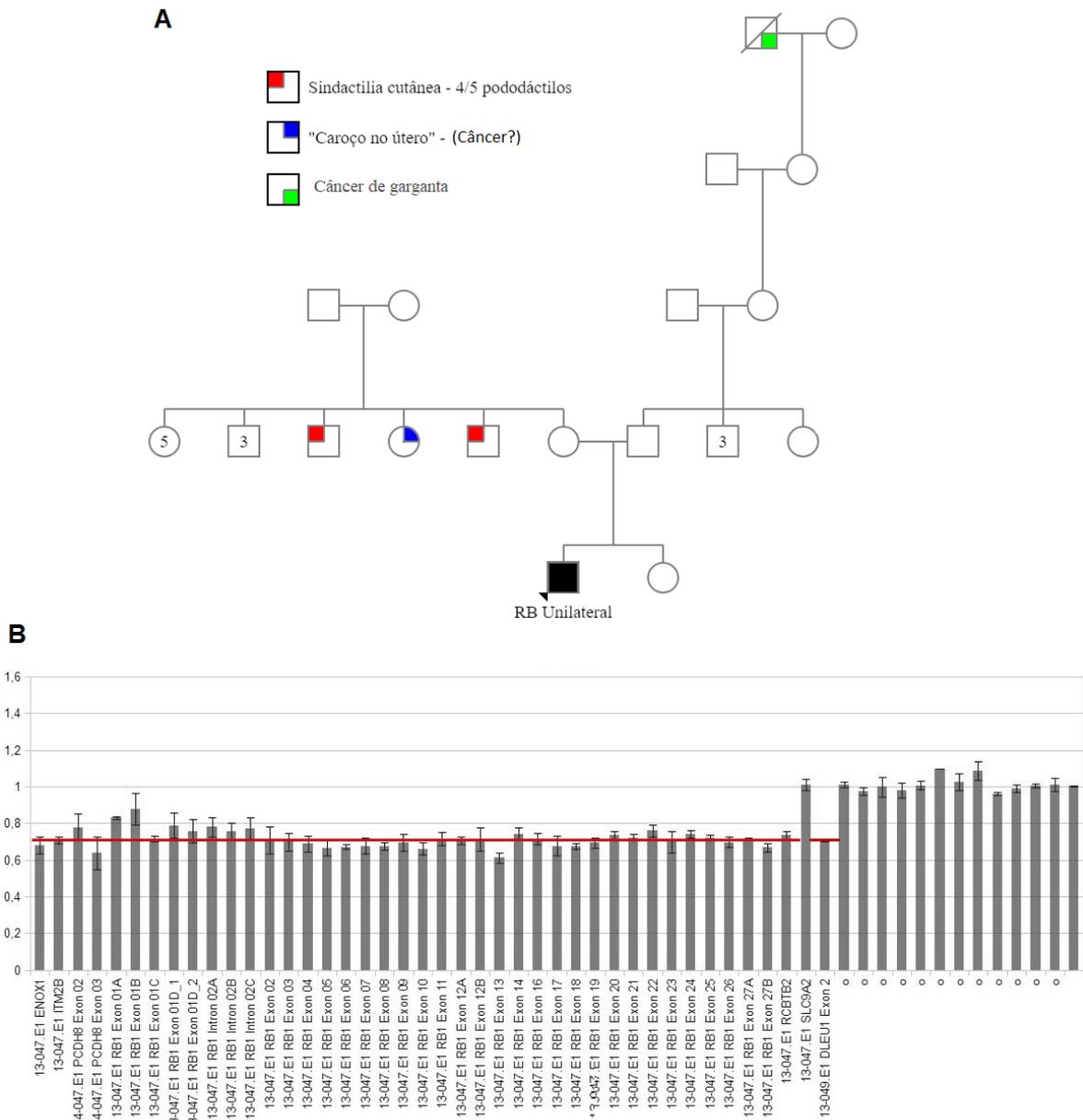


Figura 4.2: (A) Heredograma da família e (B) MLPA do paciente nº 92. O traço vermelho indica o valor de corte para deleções.

#### 4.1.1.3 Paciente nº 94

Paciente do sexo feminino, segunda filha de casal não consanguíneo, encaminhada ao ambulatório de Oncogenética do INCA por história pessoal de





## 4.2. Painel de genes em amostras pareadas

### 4.2.1 Considerações técnicas na utilização do painel de genes

O material tumoral proveniente da enucleação, fixado em formalina tamponada e posteriormente embebido em diversas camadas de parafina, armazenado a temperatura ambiente foi utilizado para extração de DNA. Porém, a fixação do material para conservação em parafina foi responsável pela degradação do DNA, resultando em amostras de baixa qualidade, como demonstrado pela análise com a plataforma TapeStation (Figura 4.5).

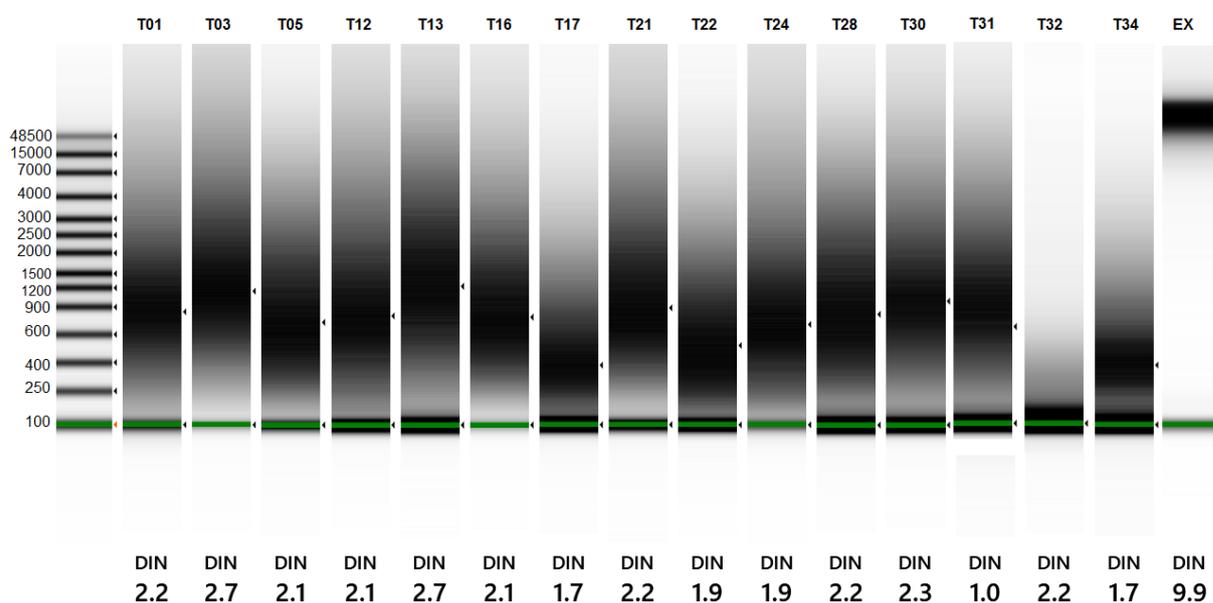


Figura 4.5: Análise da qualidade do DNA tumoral pela plataforma TapeStation. Ex = exemplo, padrão esperado para amostras com baixa degradação.

Mesmo sendo o painel de 160 genes desenhado para processamento de DNA de amostras em parafina, para amplificação de pequenos fragmentos (~160pb), apenas 24/59 (40,7%) das amostras puderam ser analisadas. Apesar da região alvo do painel, composta do conjunto de regiões codificantes e sítios canônicos de *splice* de 160 genes, não ter sido totalmente coberta, a cobertura de 81,5% foi satisfatória para o caráter exploratório deste estudo, que conseguiu identificar mutações patogênicas e os genes de maior relevância. Em relação à cobertura individual das amostras, àquela que não foi selecionada por qPCR (T32) apresentou uma menor cobertura da região alvo do painel (Figura 4.6). Apesar dessa limitação, esta

amostra não foi excluída do estudo por apresentar cobertura do *RB1* e de outros genes do painel.

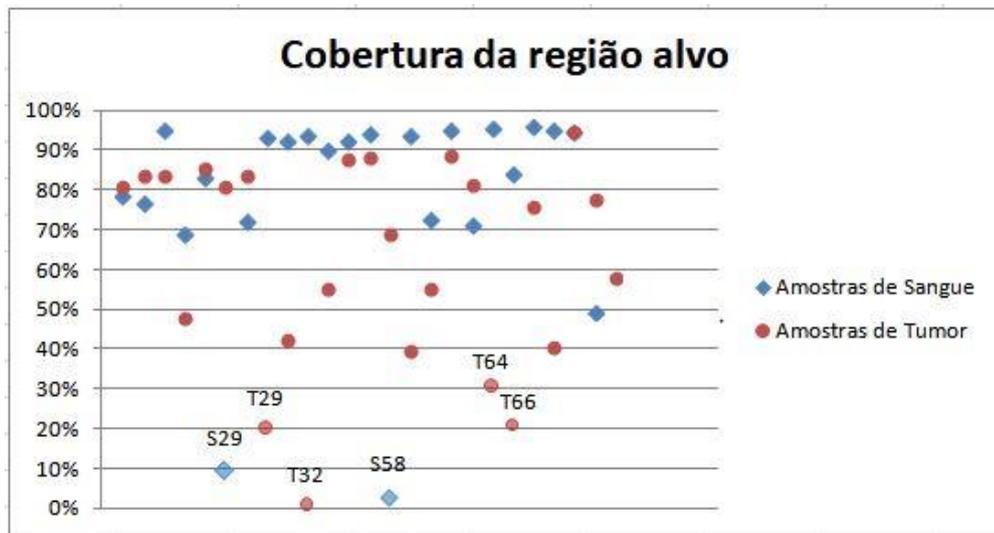


Figura 4.6: Porcentagem de cobertura da região alvo do painel de 160 genes.

Outras cinco amostras (T64, T66, T29, S29 e S58) também apresentaram baixa cobertura da região alvo (> 40%), devida a baixa eficiência da reação de enriquecimento, como pode ser observada na Figura 4.7 que mostra o produto purificado dessa amplificação. Estas amostras não foram excluídas por apresentarem cobertura do *RB1* e variantes nos genes que foram cobertos.

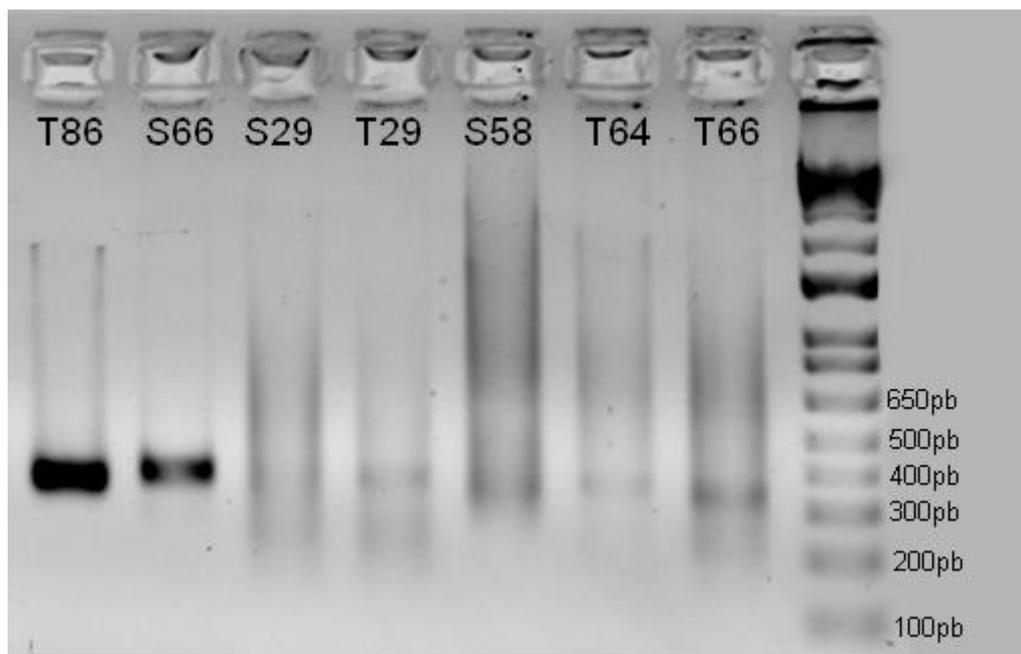


Figura 4.7: Gel de agarose mostrando padrão de bandas diferentes para amostras (T86, S66) que tiveram alta cobertura da região alvo (> 90%) e amostras (S29, T59, S58, T64, T66) com baixa cobertura.

#### 4.2.2 Avaliação dos dados de NGS com painel de genes

A corrida na plataforma HiSeq2500 gerou 289,940,374 leituras (*reads*), sendo 86,471,642 para as amostras de sangue e 203,468,732 para as amostras de tumor. Esta diferença entre os valores de leitura para cada grupo de amostra era esperada, pois por variantes somáticas necessitarem de uma maior profundidade de cobertura, as amostras de tumor foram colocadas em maior proporção na corrida. A média geral da cobertura indicada pelo número de leituras alinhadas ao longo da região alvo foi de 81,5%, sendo de 76,7% para as amostras de sangue e de 59,8% para as amostras de tumor, com média de profundidade de cobertura na região alvo de 403X, sendo 291X para as amostras de sangue e 515X para amostras de tumor. As informações da corrida estão resumidas na Tabela 4.1.

Tabela 4.1: Informações sobre a corrida de NGS

	MÉDIA (%)			MEDIANA (%)		
	Sangue	tumor	total	sangue	tumor	Total
leituras alinhadas à região alvo	80,6	63,7	72,2	92,5	77,1	82,6
bases com cobertura $\geq 10X$	91	86	89	96	92	95
bases com cobertura $\geq 30X$	84	77	80	90	85	87
bases com cobertura $\geq 100X$	63	59	61	74	68	72

Análise das 24 amostras pareadas mostrou 136 variantes patogênicas ou provavelmente patogênicas (compreendendo 125 variantes distintas) de acordo com os critérios da ACMG e com profundidade de cobertura  $\geq 50X$ , em 16 amostras tumorais e quatro amostras de sangue, distribuídas em 63 genes incluindo *RB1*. Uma grande fração (116/136) das variantes patogênicas apresentou frequências alélicas inferiores a 20%, que possivelmente estariam fora dos limites de detecção por sequenciamento de Sanger.

#### 4.2.3 Mutações no gene *RB1* com potencial patogênico

Foram inicialmente encontradas 16 variantes patogênicas (incluindo nove distintas) no *RB1*, cuja distribuição na proteína RB é representada na Figura 4.8. Das 16 mutações patogênicas descritas na Tabela 4.2, três, apresentadas em cinza, foram desconsideradas por apresentarem profundidade de cobertura inferior a 50X,

restando somente 13 (nove distintas). As 13 mutações patogênicas foram identificadas em 11 dos 24 pacientes. Duas mutações eram constitutivas, sendo encontradas em amostras de sangue e tumor (indicadas na Figura 4.8 com setas vermelhas) nos mesmos pacientes, e as 11 restantes somente em amostras tumorais.

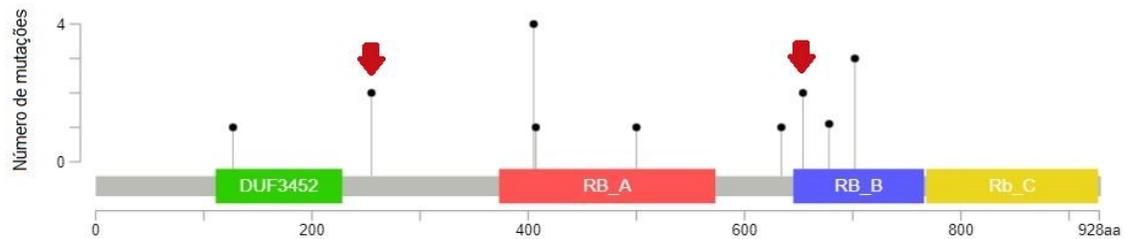


Figura 4.8: - Proteína RB e seus domínios e locais afetados pelas mutações patogênicas. As setas vermelhas indicam variantes constitutivas.

As 13 variantes foram buscadas nos seguintes bancos de dados: dbSNP, de variantes humanas (SHERRY *et al.*, 2001 - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>); Arquivo Brasileiro Online de Mutações, exclusivamente de variantes encontradas na população brasileira (AbraOM - <http://abraom.ib.usp.br/>); *Leiden Open Variation Database*, específico para o gene *RB1* (LOVD, <http://rb1-lovd.d-lohmann.de>) e COSMIC, específico para mutações somáticas (*Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer* – TATE *et al.*, 2018; <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>). Duas mutações patogênicas no *RB1* foram identificadas pela primeira vez neste trabalho (Tabela 4.3).

Tabela 4.2: Mutações patogênicas no gene *RB1*. Em cinza, variantes que apresentaram baixa cobertura (< 50X). As colunas PVS1 – PP5 indicam os critérios de classificação da ACMG, sendo preenchidos com “•” aqueles atendidos por cada variante. Referência NM\_000321.2.

Amostra	Origem	Variante	Tipo de mutação	Profundidade de Cobertura (vezes)	Profundidade de Cobertura de cada alelo	Frequência alélica	CLINVAR	VAR SOME	PVS1	PP1	PP2	PP3	PP4	PP5	PM1	PM2	PM3	PM4	PM5	PP1	PP2	PP3	PP4	PP5	
S03	cons	c.1960+1G>T	sítio de <i>splicing</i> doador	471	G = 283 T = 188	G = 0.601 T = 0.399		patogênica	•															•	
T03				965	G = 0 T = 927	G = 0.0 T = 0.961	patogênica	•																	
T13	som	c.2034_c.2035insATCA	<i>frameshift</i>	358	T = 29 TATCA = 328	T = 0.081 TATCA = 0.916		patogênica	•																•
T16	som	c.1215+1G>A	sítio de <i>splicing</i> doador	220	G = 17 A = 203	G = 0.077 A = 0.923	patogênica	patogênica	•																•
T21	som	c.380+1G>A	sítio de <i>splicing</i> doador	154	G = 143 A = 11	G = 0.929 A = 0.071	patogênica	patogênica	•																•
T31	som	c.1901C>G	<i>nonsense</i>	76	C = 59 G = 17	C = 0.776 G = 0.224		patogênica	•																•
T32	som	c.1215+1G>A	sítio de <i>splicing</i> doador	4	G = 0 A = 4	G = 0.0 A = 1.0	patogênica	patogênica	•																•
T37	som	c.2106+1G>T	sítio de <i>splicing</i> doador	52	G = 40 T = 12	G = 0.769 T = 0.231		patogênica	•																•
T46	som	c.1215+1G>A	sítio de <i>splicing</i> doador	6	G = 0 A = 6	G = 0.0 A = 1.0	patogênica	patogênica	•																•
T60	som	c.1498+2T>G	sítio de <i>splicing</i> doador	215	T = 140 G = 72	T = 0.651 G = 0.335		patogênica	•																•
T64	som	c.1218_1219del	<i>frameshift</i>	312	CT = 176 C = 135	CT = 0.564 C = 0.433		patogênica	•																•
T75	som	c.2106+1G>T	sítio de <i>splicing</i> doador	50	G = 43 T = 8	G = 0.84 T = 0.16		patogênica	•																•

Amostra	Origem	Variante	Tipo de mutação	Profundidade de Cobertura (vezes)	Profundidade de Cobertura de cada alelo	Frequência alélica	CLINVAR	VAR SOME	P V S 1	P S 1	P S 2	P S 3	P S 4	P M 1	P M 2	P M 3	P M 4	P M 5	P M 6	P P 1	P P 2	P P 3	P P 4	P P 5	
S80	cons	c.763C>T	nonsense	38	C = 25 T = 13	C = 0.658 T = 0.342		patogênica	•																
T80				42	C=0 T=41	C=0.0 T=0.976		patogênica	•																
T86	som	c.2106+1G>T	sítio de splicing doador	511	G = 227 T = 282	G = 0.444 T = 0.552		patogênica	•																•
T87	som	c.1215+1G>A	sítio de splicing doador	43	G = 0 A = 38	G = 0.0 A = 0.884	patogênica	patogênica	•																•

Tabela 4.3: Busca das mutações patogênicas em diversos bancos de dados. Em cinza, variantes descritas pela primeira vez no presente estudo. Referência NM\_000321.2

Amostra	Variante	dbSNP ID	ABraOM	LOVD	COSMIC ID
S03					
T03	c.1960+1G>T	-	-	DESCRITA 1x	-
T13	c.2034_c.2035insATCA	-	-	-	-
T16	c.1215+1G>A	rs587776783	-	DESCRITA 64x	COSM1152654
T21	c.380+1G>A	rs1131690902	-	DESCRITA 4x	-
T31	c.1901C>G	-	-	DESCRITA 1x	COSM254914
T37	c.2106+1G>T	-	-	-	COSM317962
T60	c.1498+2T>G	-	-	DESCRITA 2x	-
T64	c.1218_1219del	-	-	-	-
T75	c.2106+1G>T	-	-	-	COSM317962
S80	c.763C>T	rs587778842	-	DESCRITA 46x	COSM943
T80					
T86	c.2106+1G>T	-	-	-	COSM317962

Oito amostras tumorais mostraram variação de número de cópias, cinco com deleções completas de *RB1* (duas em homozigose e três em heterozigose), e três com ampliações. As cinco deleções foram consideradas como alterações patogênicas. Os dados de CNV foram confirmados e validados por MLPA em 10 amostras tumorais, em vista da confiabilidade, previamente testada, da metodologia para analisar amostras tumorais. A confiabilidade foi demonstrada após ser confirmada, em uma amostra de DNA tumoral, uma deleção constitutiva previamente identificada em uma amostra pareada de DNA de sangue (Figura 4.9).

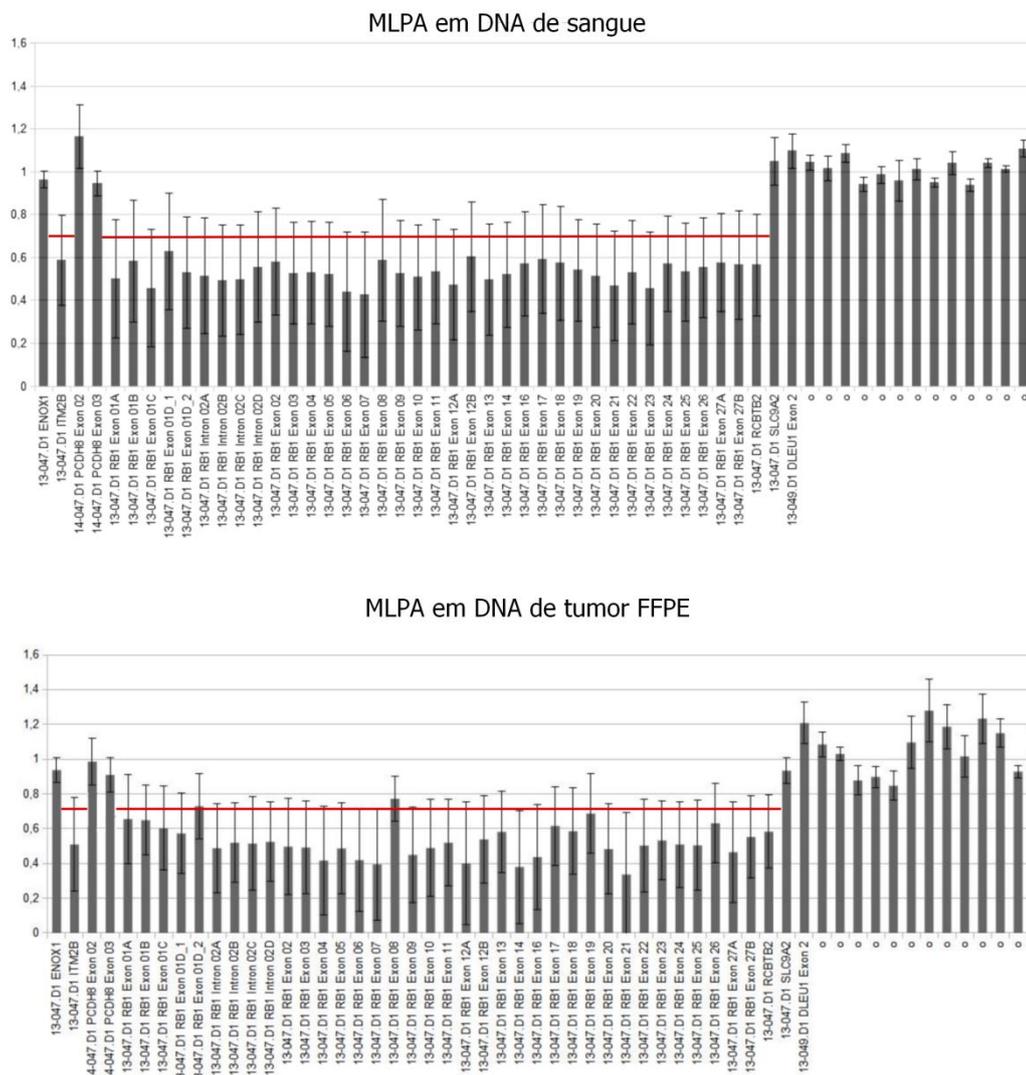


Figura 4.9: MLPA de DNA de sangue e tumor em parafina. Os resultados foram concordantes.

#### 4.2.4 Descrição de casos com alterações patogênicas no RB1

##### 4.2.4.1 Paciente nº 03

Paciente do sexo feminino, filha de casal não consanguíneo, encaminhada ao ambulatório de Oncogenética do INCA por história pessoal de retinoblastoma unilateral à esquerda diagnosticado com dois anos, tendo como sintoma a leucocoria. A história familiar relatou casos de sarcoma, câncer de mama e estômago, porém sem relatos de neoplasias oculares, crianças com atraso de desenvolvimento/deficiência intelectual ou síndromes malformativas (Figura 4.10). O exame físico morfológico não demonstrou malformações maiores e o exame neurológico não constatou atraso do desenvolvimento.

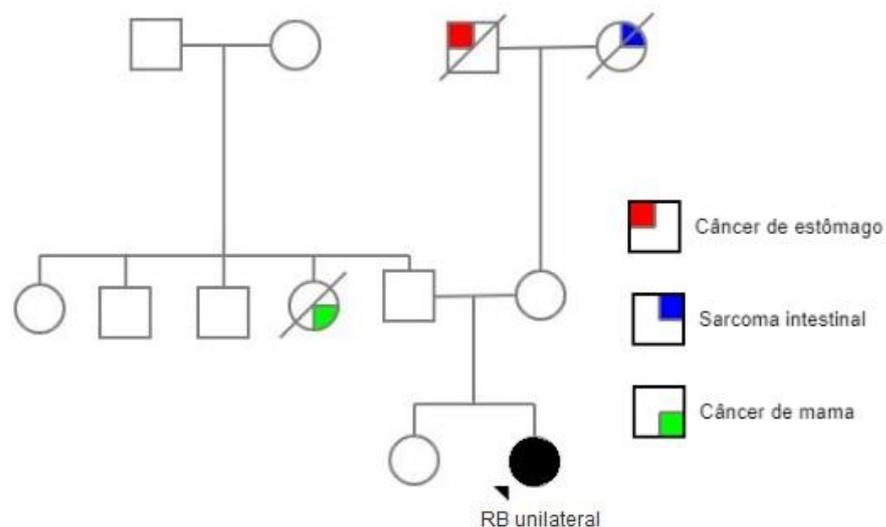


Figura 4.10: Heredograma da família da paciente nº 03.

A paciente apresentou a mutação constitutiva c.1960+1G>T em heterozigose na amostra de sangue e em homozigose na amostra tumoral. Na amostra de sangue, a mutação foi confirmada por Sequenciamento de Sanger (Figura 4.11). A análise de CNV no tumor não mostrou alterações.

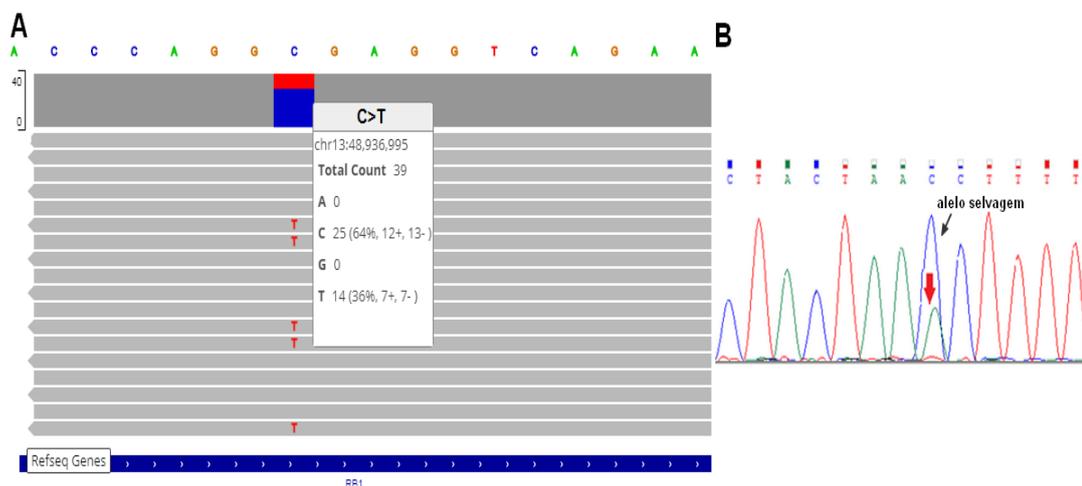


Figura 4.11: Mutação constitutiva encontrada na amostra S03. (A) Detalhes sobre a profundidade de cobertura de cada alelo e porcentagem de leitura de cada fita por NGS. (B) Confirmação da mutação na amostra de DNA de sangue por sequenciamento de Sanger. A seta vermelha indica o alelo mutado.

#### 4.2.4.2 Paciente nº 06

Paciente do sexo masculino, encaminhado ao ambulatório de Oncogenética do INCA por história pessoal de retinoblastoma unilateral à esquerda diagnosticado com dois anos e nove meses, tendo como sintoma a leucocoria. Informações sobre o histórico familiar não estavam disponíveis. O exame físico morfológico não demonstrou malformações aparentes o exame neurológico não constatou atraso do desenvolvimento.

A análise de CNV no tumor apresentou deleção completa do gene *RB1* em heterozigose (Figura 4.12).

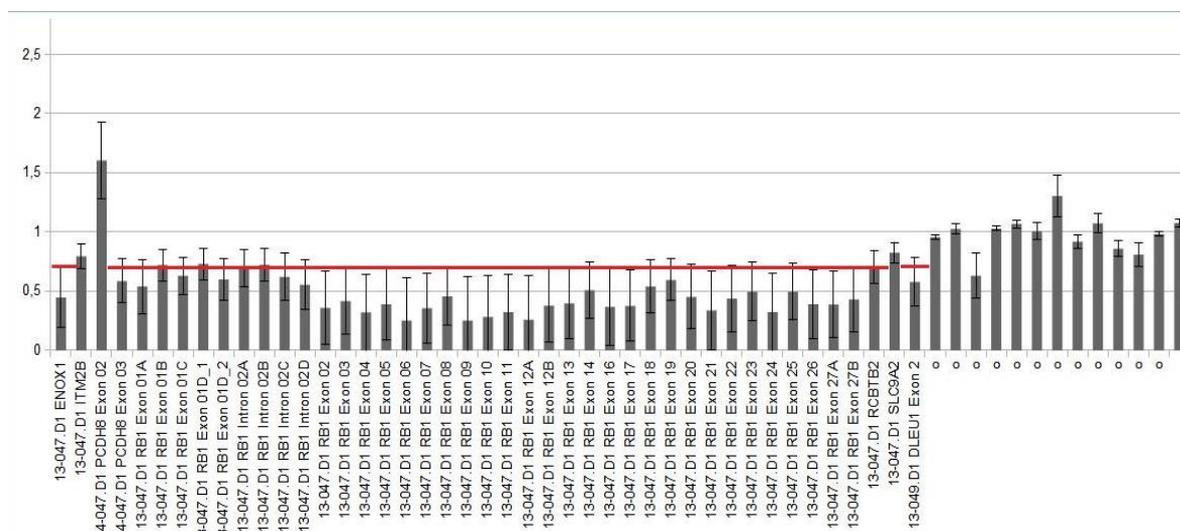


Figura 4.12: MLPA do paciente nº 06. O traço vermelho indica o valor de corte para deleções

#### 4.2.4.3 Paciente nº 13

Paciente do sexo masculino, encaminhado ao ambulatório de Oncogenética do INCA por história pessoal de retinoblastoma unilateral à esquerda. Informações sobre o histórico familiar e dados clínico-patológicos não estavam disponíveis.

O paciente apresentou a inserção c.2034\_c.2035insATCA em homozigose na sua amostra tumoral. A análise de CNV no tumor não apresentou alterações.

#### 4.2.4.4 Paciente nº 16

Paciente do sexo feminino, encaminhada ao ambulatório de Oncogenética do INCA por história pessoal de retinoblastoma unilateral à direita diagnosticado aos 12 meses, tendo como primeiro sintoma a leucocoria presente desde os quatro meses de vida. O exame físico morfológico não demonstrou malformações maiores e o exame neurológico não constatou atraso do desenvolvimento.

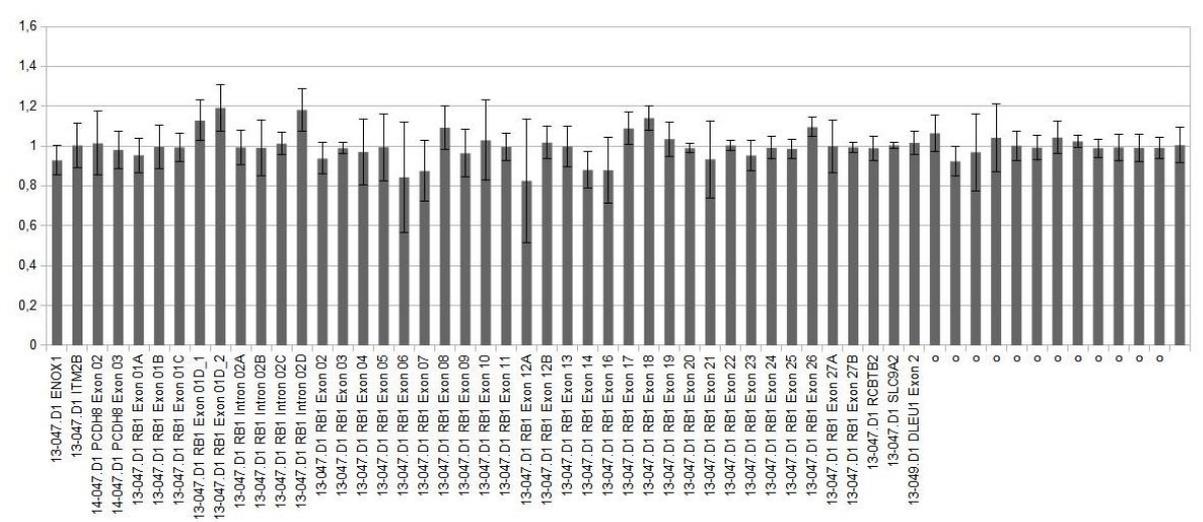


Figura 4.13: MLPA do tumor da paciente nº 16 com ausência de deleções.

A paciente apresentou a mutação c.1215+1G>A em homozigose na sua amostra tumoral. A análise de CNV no tumor por NGS não apresentou alterações, o que foi confirmado por MLPA (Figura 4.13).

#### 4.2.4.5 Paciente nº 21

Paciente do sexo masculino, filho de casal não consanguíneo, foi encaminhado ao ambulatório de Oncogenética do INCA por história pessoal de retinoblastoma unilateral à direita diagnosticado aos 24 meses, tendo como primeiro sintoma a leucocoria. Não foi relatada a incidência de retinoblastoma ou outros tipos de câncer na família. O exame físico morfológico não demonstrou malformações maiores e o exame neurológico não constatou atraso do desenvolvimento.

O paciente apresentou a mutação c.380+1G>A em homozigose na sua amostra tumoral. A análise de CNV no tumor não apresentou alterações.

#### 4.2.4.6 Paciente nº 31

Paciente do sexo masculino, encaminhado ao ambulatório de Oncogenética do INCA por história pessoal de retinoblastoma bilateral extraocular diagnosticado aos 17 meses, tendo como primeiros sintomas a leucocoria e presença de secreções nos olhos. O paciente não possuía registros de exames para detectar malformações ou atraso psicomotor. Informações sobre o histórico familiar não estavam disponíveis.

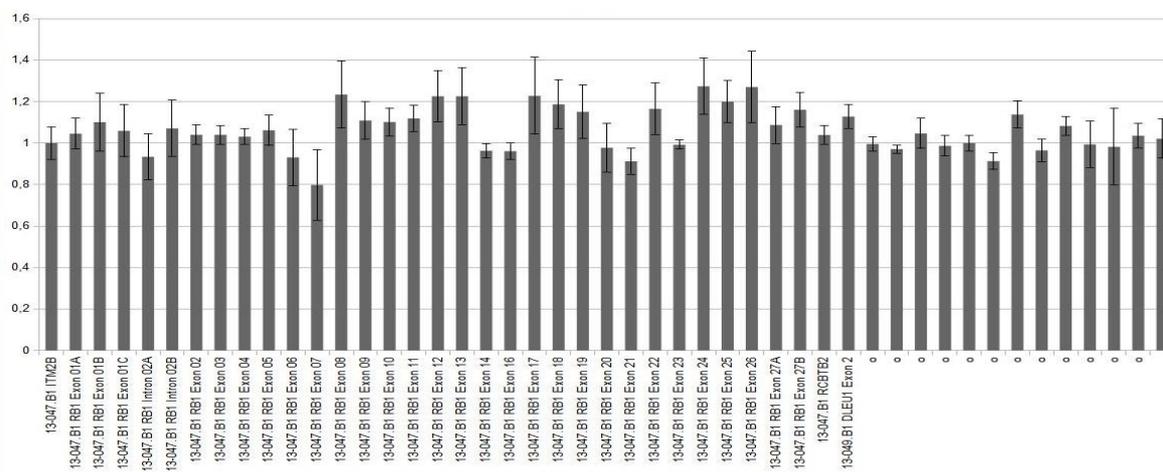


Figura 4.14: MLPA do tumor do paciente nº 31 com ausência de deleções.

O paciente apresentou a mutação constitutiva c.1901C>G com frequência aproximada de 23% na amostra tumoral. A análise de CNV não mostrou alterações, o que foi confirmado por MLPA (Figura 4.14).

#### 4.2.4.7 Paciente nº 37

Paciente do sexo masculino, filho de casal não consanguíneo, encaminhado ao ambulatório de Oncogenética do INCA por história pessoal de retinoblastoma unilateral à esquerda e multifocal, tendo como primeiro sintoma o estrabismo. Não foi relatada a incidência de retinoblastoma ou outros tipos de câncer na família. O exame físico morfológico não demonstrou malformações maiores e o exame neurológico não constatou atraso do desenvolvimento.

O paciente apresentou a mutação c.2106+1G>T com aproximadamente 23% de frequência na amostra tumoral. A análise de CNV no tumor revelou deleção bialélica de *RB1* e de genes adjacentes que foi confirmada por MLPA (Figura 4.15).

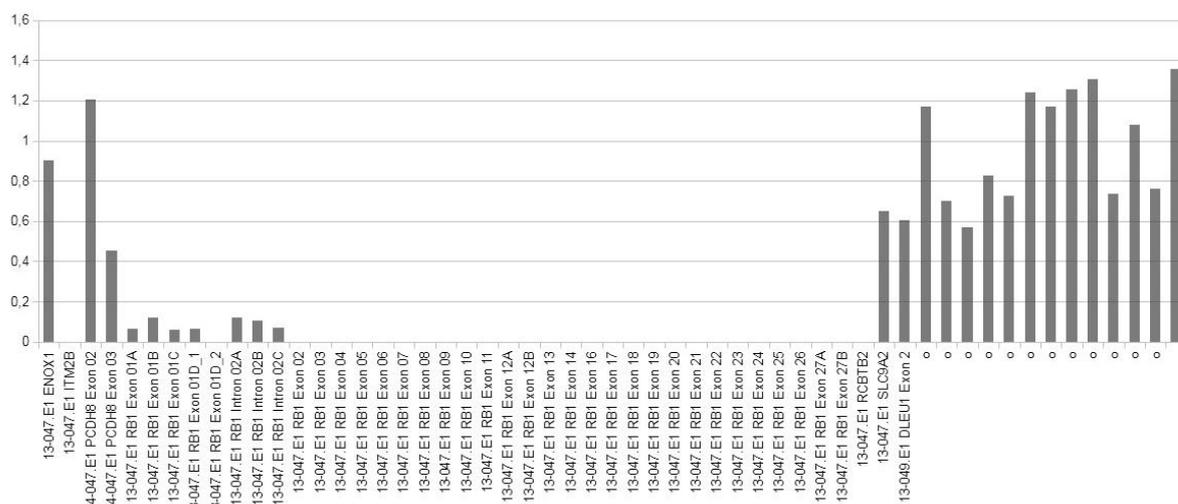


Figura 4.15: MLPA do tumor do paciente nº 37. Ausência de sinal das sondas localizadas no *RB1* e nos genes adjacentes *ITM2B* e *RCBTB2*.

#### 4.2.4.8 Paciente nº 46

Paciente do sexo masculino, filho de casal consanguíneo, encaminhado ao ambulatório de Oncogenética do INCA por história pessoal de retinoblastoma unilateral à direita diagnosticado aos 18 meses, tendo como primeiro sintoma o estrabismo. Não foi relatada a incidência de retinoblastoma ou outros tipos de câncer na família.

A análise de CNV no tumor apresentou deleção completa do gene *RB1* em heterozigose (Figura 4.16).

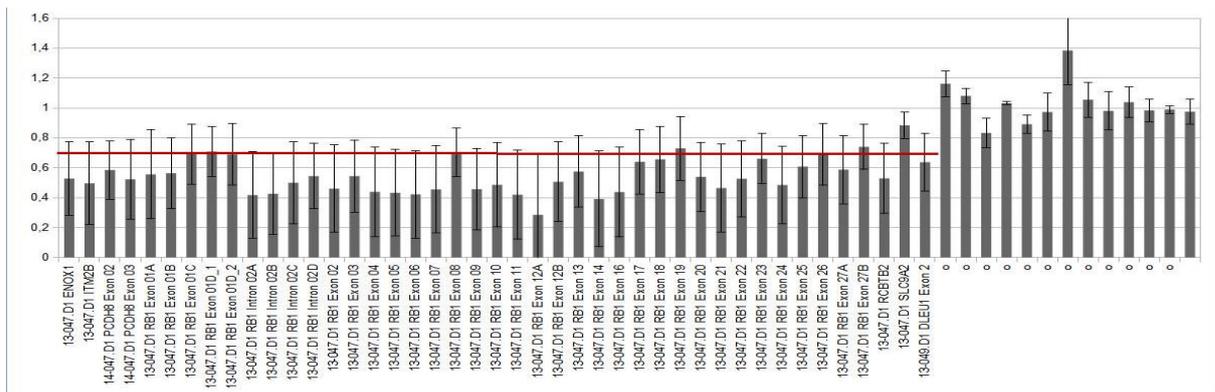


Figura 4.16: MLPA do tumor do paciente nº 46. O traço vermelho indica o valor de corte para deleções.

#### 4.2.4.9 Paciente nº 58

Paciente do sexo feminino, encaminhada ao ambulatório de Oncogenética do INCA por história pessoal de retinoblastoma unilateral à esquerda diagnosticado aos nove meses, tendo como primeiro sintoma a leucocoria presente desde o quarto mês de vida. Informações sobre exames físico-morfológico e neurológico não estavam disponíveis. A irmã da paciente possuía retinoma, precursor benigno do retinoblastoma.

Apesar de não ter sido possível realizar a análise de CNV no tumor por NGS, o *RB1* foi analisado por MLPA (Figura 4.17), que detectou deleção em heterozigose deste gene na amostra tumoral assim como dos genes adjacentes (*ITM2B*, *RCBTB2* e *DLEU1*).

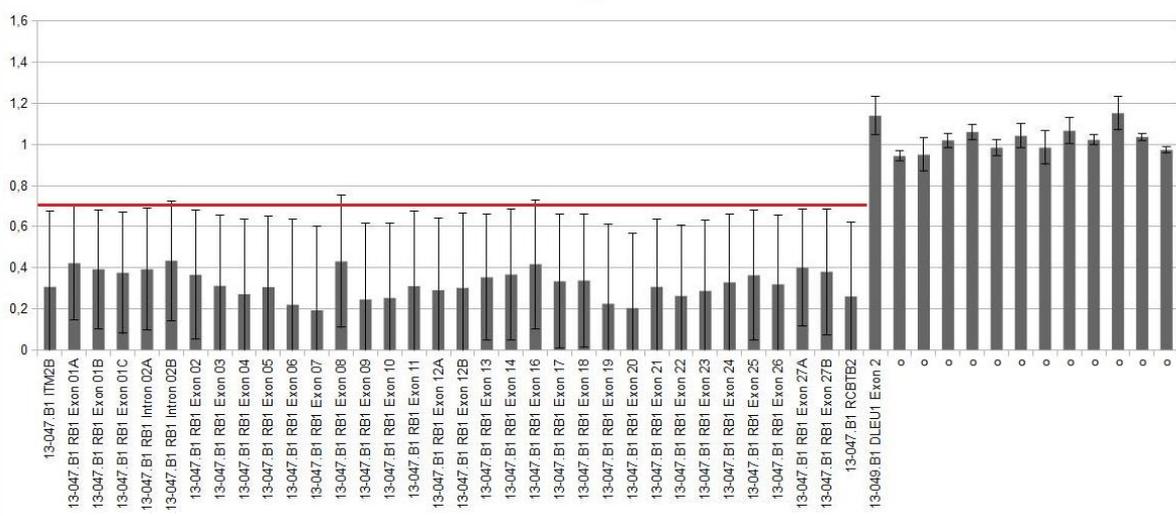


Figura 4.17: MLPA do tumor do paciente nº 58. O traço vermelho indica o valor de corte para deleções

#### 4.2.4.10 Paciente nº 60

Paciente do sexo masculino, encaminhado ao ambulatório de Oncogenética do INCA por história pessoal de retinoblastoma unilateral à direita diagnosticado aos 10 meses, tendo como primeiro sintoma a leucocoria. Não foi relatada a incidência de retinoblastoma ou outros tipos de câncer na família. Informações sobre exames físico-morfológico e neurológico não estavam disponíveis.

O paciente apresentou a mutação c.1498+2T>G com aproximadamente 34% de frequência na amostra tumoral. A análise de CNV no tumor não mostrou alterações.

#### 4.2.4.11 Paciente nº 64

Paciente do sexo masculino, encaminhado ao ambulatório de Oncogenética do INCA por história pessoal de retinoblastoma bilateral, sendo multifocal no olho esquerdo, diagnosticado aos 14 meses. O primeiro sintoma apresentado foi a leucocoria. A história familiar relatou casos de câncer de útero, de próstata e no cérebro como mostra o heredograma na Figura 4.18, mas não houve relatos de neoplasias oculares, crianças com atraso de desenvolvimento/deficiência intelectual ou síndromes malformativas. O exame físico morfológico não demonstrou malformações maiores e o exame neurológico não foi realizado.

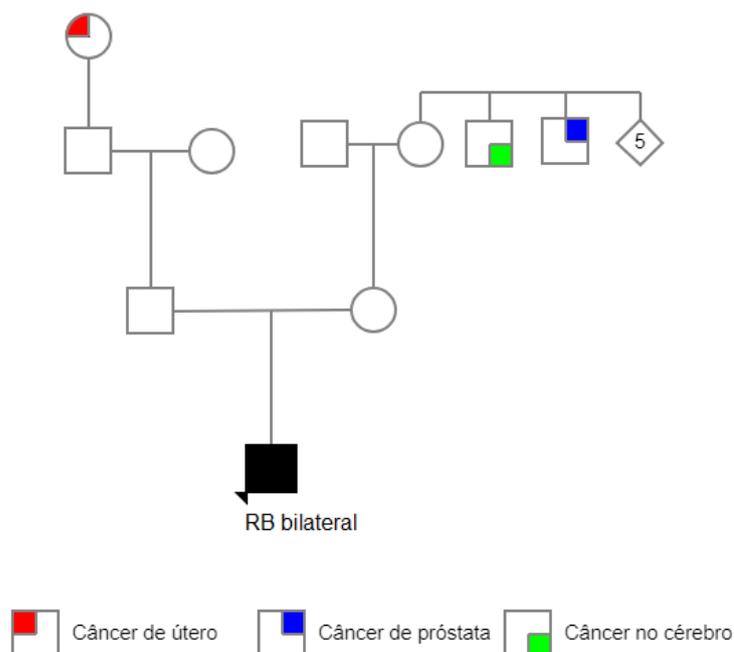


Figura 4.18: Heredograma da família da paciente nº 64.

O paciente apresentou a deleção c.1218\_1219del em heterozigose na amostra tumoral. A análise de CNV no tumor não apresentou alterações.

#### 4.2.4.12 Paciente nº 66

Paciente do sexo feminino, encaminhada ao ambulatório de Oncogenética do INCA por história pessoal de retinoblastoma unilateral à direita diagnosticado aos seis meses, tendo como primeiro sintoma o estrabismo. Não possuía histórico familiar de retinoblastoma. Mais informações sobre o histórico familiar, exames físico morfológico e neurológico não estavam disponíveis. A análise de CNV no tumor apresentou deleção completa do *RB1* em heterozigose (Figura 4.19).

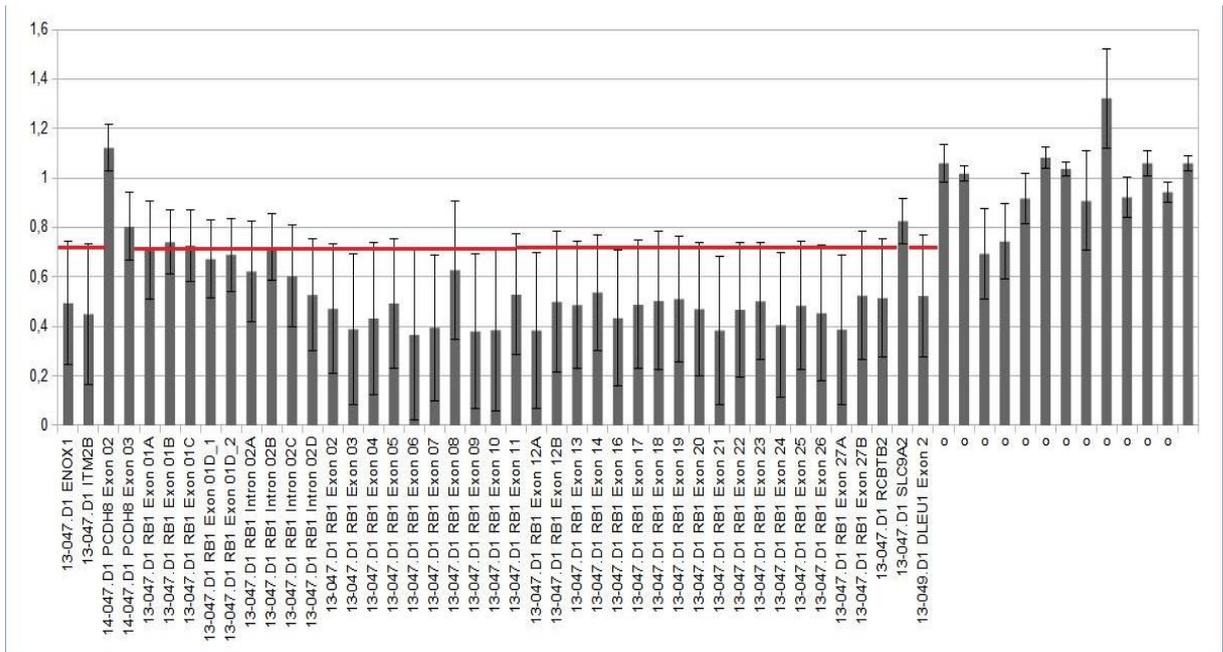


Figura 4.19: MLPA do tumor do paciente nº 66. O traço vermelho indica o valor de corte para deleções.

#### 4.2.4.13 Paciente nº 75

Paciente do sexo feminino, encaminhada ao ambulatório de Oncogenética do INCA por história pessoal de retinoblastoma unilateral à direita diagnosticado aos 36 meses, tendo como primeiro sintoma a leucocoria, observada desde o segundo ano de vida. Como mostra o heredograma da Figura 4.20, houve um caso de câncer de

próstata na família, mas não foi relatada a incidência de retinoblastoma, crianças com atraso de desenvolvimento/deficiência intelectual ou síndromes malformativas. O exame físico morfológico não demonstrou malformações maiores e o exame neurológico não constatou atraso do desenvolvimento.

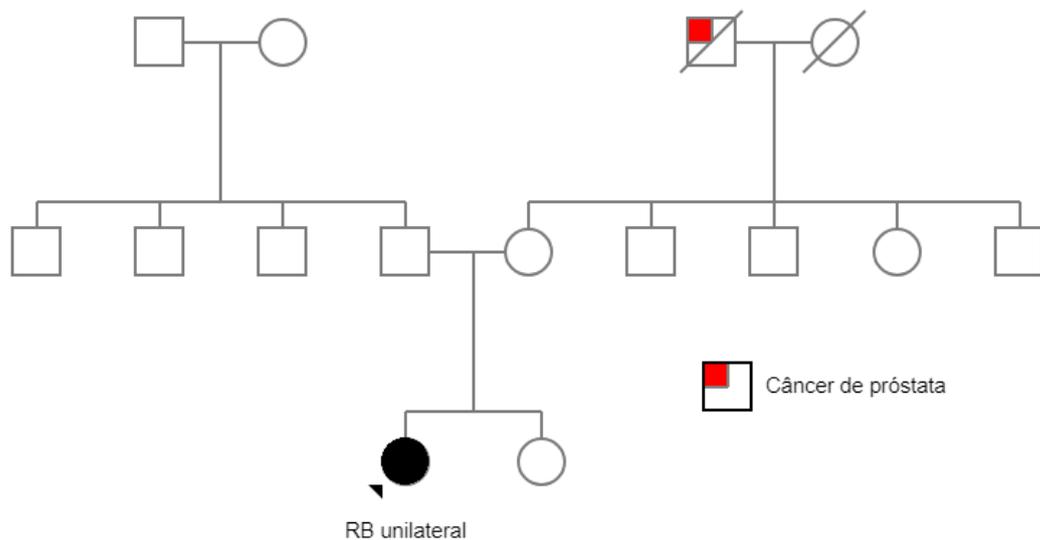


Figura 4.20: Heredograma da família do paciente nº 75.

A paciente apresentou a mutação c.2106+1G>T com aproximadamente 16% de frequência na amostra tumoral. A análise de CNV no tumor revelou deleção bialélica de *RB1* e de genes adjacentes, o que foi confirmado por MLPA (Figura 4.21).

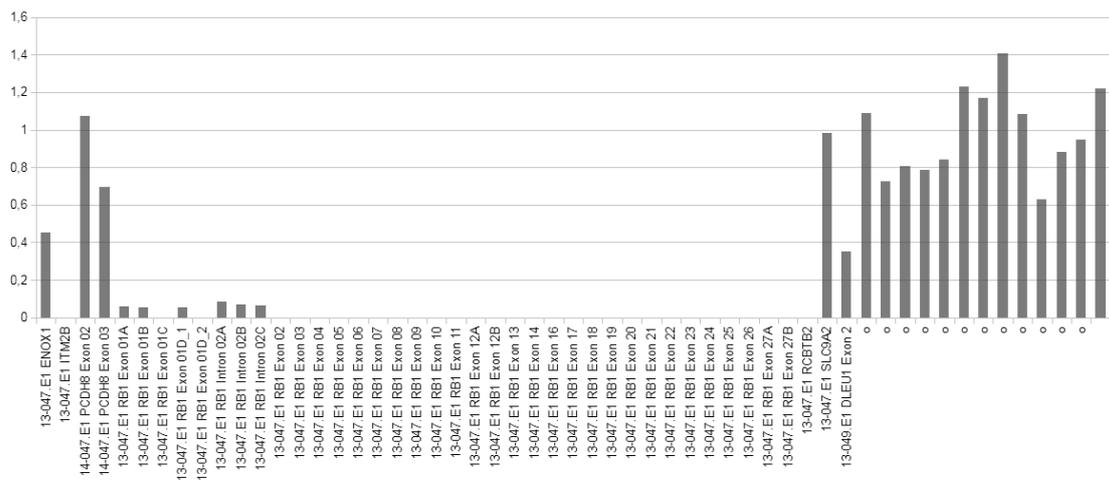


Figura 4.21: MLPA do tumor da paciente nº 75. Ausência de sinal das sondas do *RB1* e dos genes adjacentes *ITM2B* e *RCBTB2*, e deleção em heterozigose de *ENOX1* e *DLEU1*.

#### 4.2.4.14 Paciente nº 80

Paciente do sexo masculino, encaminhado ao ambulatório de Oncogenética do INCA por história pessoal de retinoblastoma unilateral à direita. Não foi relatada a incidência de retinoblastoma ou outros tipos de câncer na família. Informações sobre histórico familiar, exames físico morfológico ou neurológico não estavam disponíveis.

O paciente apresentou a mutação constitutiva c.763C>T em heterozigose na amostra de sangue e homozigose na amostra tumoral. Na amostra de sangue, apesar da alta profundidade de cobertura (> 400X), houve um alarmante viés de fita (*strand bias*), por desbalanço entre leituras das fitas do DNA (Figura 4.22A) que aumenta as chances de detecção de falsos positivos (GUO *et al.*, 2012). Por este motivo, a mutação foi confirmada por sequenciamento de Sanger (Figura 4.22B).

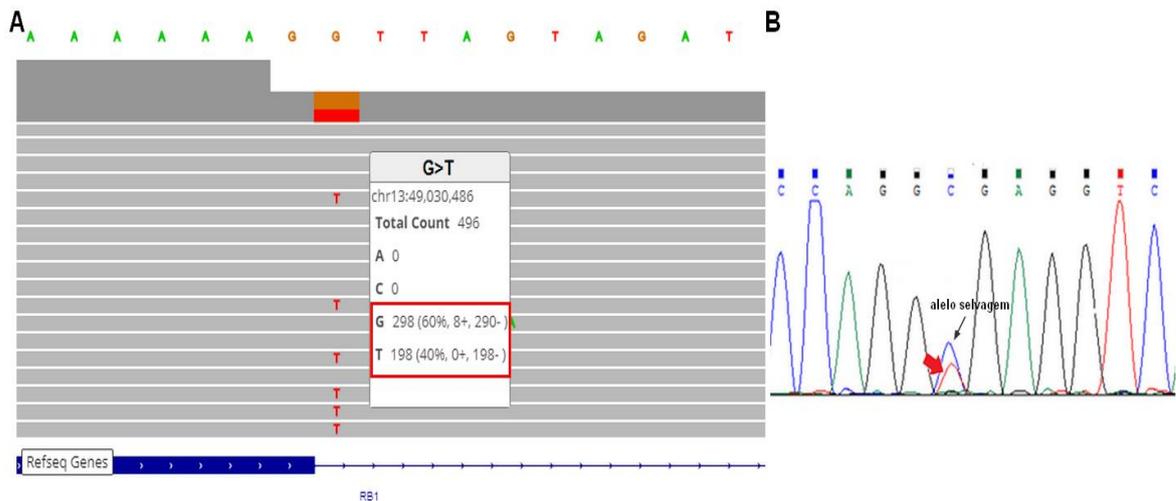


Figura 4.22: Mutação constitutiva encontrada na amostra S80. (A) Detalhes sobre a profundidade de cobertura de cada alelo e porcentagem de leitura de cada fita por NGS. A caixa vermelha indica viés de fita (*strand bias*). (B) Confirmação da mutação na amostra de DNA de sangue por sequenciamento de Sanger. A seta vermelha indica o alelo mutado.

A análise de CNV não apresentou alterações na amostra tumoral, o que foi confirmado por MLPA (Figura 4.23).

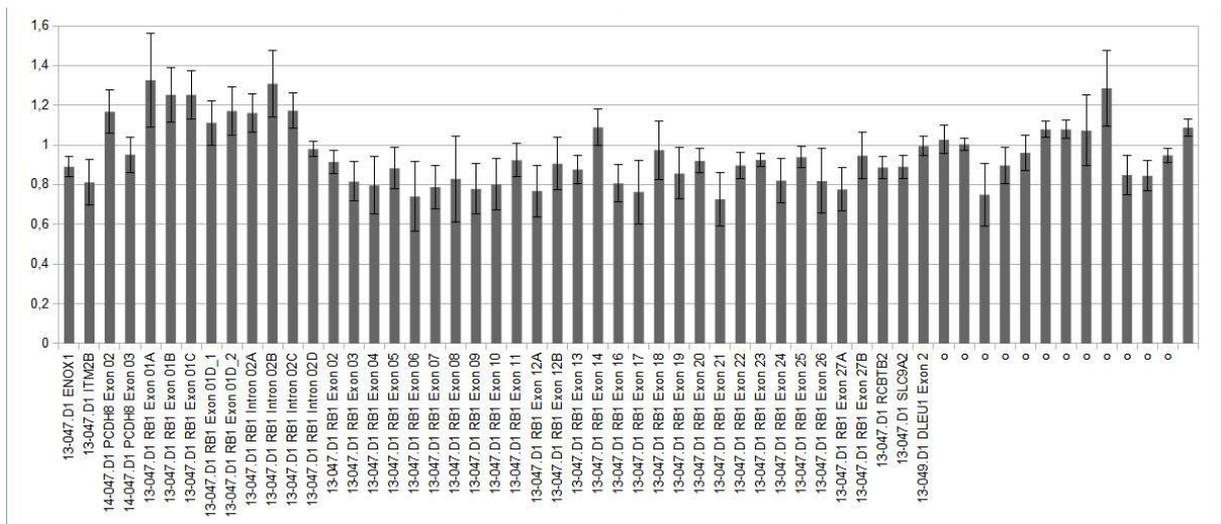


Figura 4.23: - MLPA do tumor do paciente n° 80 com ausência de deleções

#### 4.2.4.15 Paciente n° 86

Paciente do sexo masculino, filho de casal não consanguíneo, encaminhado ao ambulatório de Oncogenética do INCA por história pessoal de retinoblastoma unilateral à direita diagnosticado no sétimo mês de vida, tendo como primeiros sintomas a leucocoria e o estrabismo. Não foi relatada a incidência de retinoblastoma ou outros tipos de câncer na família.

O paciente apresentou a mutação c.2106+1G>T em heterozigose na amostra tumoral. A análise de CNV no tumor não apresentou alterações.

#### 4.2.5 Pacientes sem alterações patogênicas no RB1

Outros 9 pacientes não apresentaram alterações patogênicas no *RB1*. Em dois destes, foram encontradas variantes patogênicas, porém que não foram consideradas pela baixa profundidade de cobertura. Em duas amostras (T41 e T59) a ausência de eventos de CNV foi confirmada por MLPA (Figura 4.24).

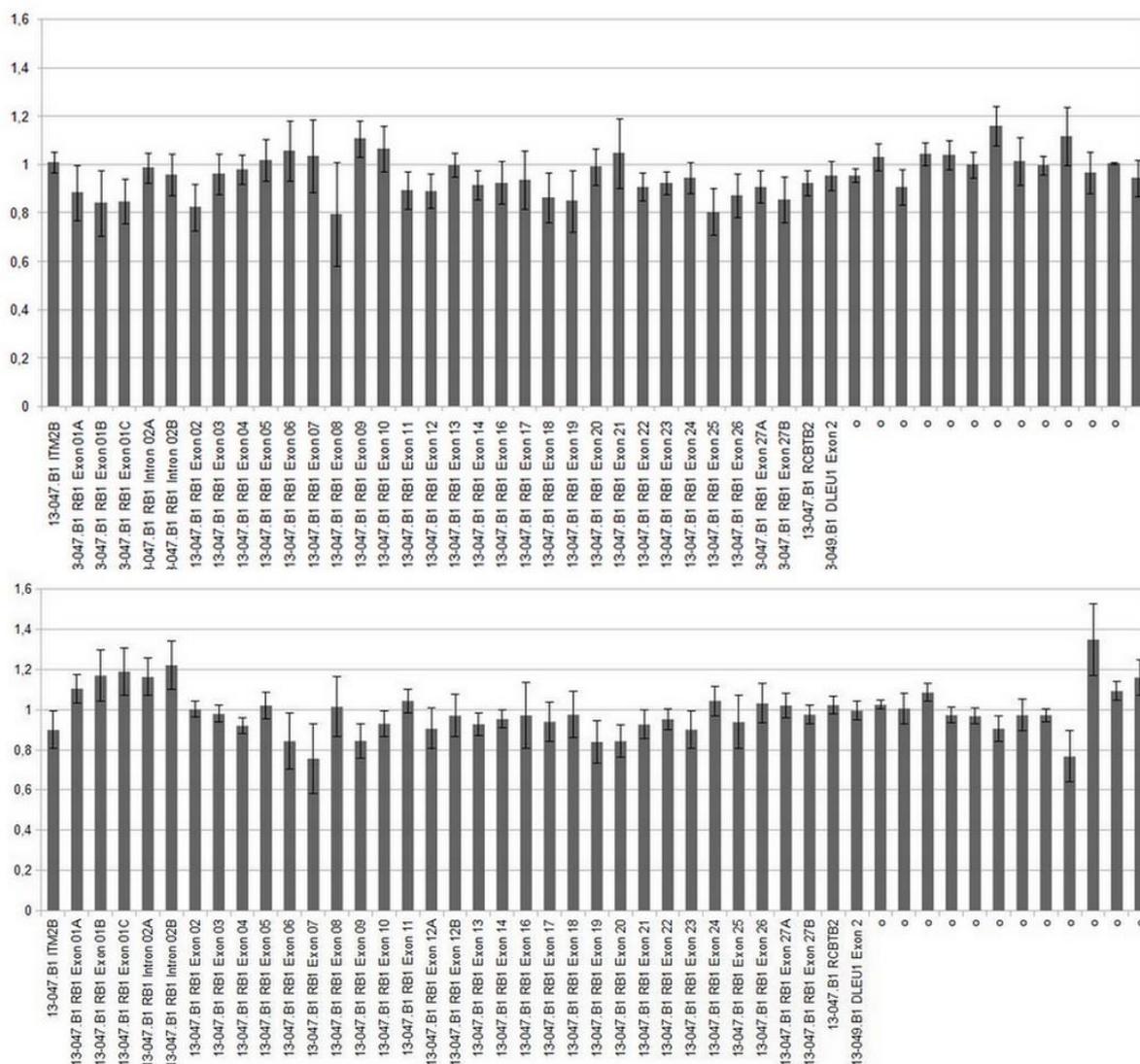


Figura 4.24: MLPA dos tumores dos pacientes nº 41 (acima) e nº 59 (abaixo) com ausência de deleções.

#### 4.2.6 Análise de associação entre alterações patogênicas no RB1 e características clínico-patológicas

Nas análises de associação, a presença de alteração somática no gene *RB1* não apresentou relação com sexo, lateralidade, primeiro sintoma apresentado, histórico familiar de retinoblastoma ou idade no diagnóstico (Tabela 4.4).

Tabela 4.4: Análises de associação entre características dos pacientes e presença de alteração no gene *RB1*. O símbolo\* indica análise realizada pelo teste de comparação de médias, sendo as outras realizadas com o teste exato de Fisher. HF: histórico familiar de RB, ID: idade no diagnóstico (em meses).

	Com <i>RB1</i> mutado	Sem <i>RB1</i> mutado	<i>p</i>
<b>Sexo</b>			
Masculino	10	5	0,679
Feminino	5	4	
<b>Lateralidade</b>			
Unilateral	13	7	0,612
Bilateral	2	2	
<b>Sintoma</b>			
Estrabismo	3	3	0,821
Leucocoria	11	6	
Outros	1	1	
<b>HF</b>			
Com retinoma	2	1	1,00
Sem retinoma	13	8	
<b>ID*</b>			
Média	17,13	22,78	0,256

#### 4.2.7 Variantes de significado incerto (VUS) no gene *RB1*

Após a classificação das variantes com profundidade de cobertura  $\geq 50X$  segundo os critérios da ACMG, 15 variantes (13 distintas) foram definidas como de significado incerto (VUS), sendo 10 somente somáticas, uma constitutiva nas amostras pareadas S80 e T80 de um paciente, e três constitutivas encontradas somente em amostras de sangue (Tabela 4.5). A falta de detecção dessas três variantes constitutivas nas amostras tumorais pareadas deveu-se a uma baixa profundidade de cobertura ( $< 50X$ ) dessas variantes nas amostras tumorais.

Os critérios atendidos por cada variante através da análise pelo VARSOME, assim como os programas de predição utilizados (quando aplicáveis de acordo ao critério PP3) e seus vereditos estão expostos na Tabela 4.5. Nesta tabela também estão contidos os resultados da busca no banco de dados LOVD, onde estava registrada apenas uma das variantes (c.718+35A>T), e o resultado da análise no *Human Splicing Finder*, que indicou seis variantes com potencial de afetar o *splicing*.

Tabela 4.5: Variantes de significado incerto no gene *RB1*. As colunas PM1 – PP3 indicam os critérios de classificação da ACMG, sendo preenchidos com “•” aqueles atendidos por cada variante. som = somática; cons = constitutiva

Amostra	Origem	Variante	Tipo de mutação	Profundidade de Cobertura (vezes)	Profundidade de cobertura de cada alelo	Frequência alélica	LOVD - <i>RB1</i>	HSF	VARSOME	P 1	P 2	P 3	P 3	Múltiplas evidências computacionais por programas de predição acusando patogenicidade (PP3)
T05	som	c.1714C>T	<i>missense</i>	206	C=196 T=10	C=0.951 T=0.049	não encontrada	criação de sítios silenciadores de exons (ESS), potencial alteração do splicing	VUS	•	•	•	•	DANN, GERP, dbNSFP.FATHMM, LRT, MetaLR, MetaSVM, MutationAssessor e MutationTaster (classificada como benigna pelo PROVEAN)
T06	som	c.2673C>T	sinônima	613	C=584 T=29	C=0.953 T=0.047	não encontrada	provavelmente não altera o splicing	VUS	•				
T21	som	c.718+28C>T	intrônica	777	C=743 T=34	C=0.956 T=0.044	não encontrada	provavelmente não altera o splicing	VUS	•				
T21	som	c.2398C>T	<i>missense</i>	229	C=217 T=12	C=0.948 T=0.052	não encontrada	alteração dos sítios potencializadores de splicing de exons (ESE), potencial alteração do splicing	VUS	•			•	DANN, GERP, dbNSFP.FATHMM, LRT, MetaLR, MetaSVM e MutationTaster (classificada como benigna pelo MutationAssessor e PROVEAN).
T29	som	c.2106+24T>G	intrônica	302	T=162 G=140	T=0.536 G=0.464	não encontrada	provavelmente não altera o splicing	VUS				•	GERP (sem predições benignas)
S32	cons	c.2106+24T>G	intrônica	290	T=147 G=143	T=0.507 G=0.493	não encontrada	provavelmente não altera o splicing	VUS				•	GERP (sem predições benignas)
S62	cons	c.1461G>A	sinônima	357	G=339 A=18	G=0.95 A=0.05	não encontrada	provavelmente não altera o splicing	VUS	•	•			
S62	cons	c.2490-3C>G	sítio de splicing	155	C=84 G=71	C=0.542 G=0.458	não encontrada	ativa um sítio acceptor críptico e altera um sítio acceptor, muito provavelmente altera o splicing	VUS	•			•	DANN, GERP and dbSNV-splicing (sem predições benignas)
T62	som	c.1835C>T	<i>missense</i>	312	C=294 T=18	C=0.942 T=0.058	não encontrada	alteração dos sítios potencializadores de splicing de exons (ESE), potencial alteração do splicing	VUS	•	•		•	DANN, GERP, dbNSFP.FATHMM, LRT, MetaLR, MetaSVM e MutationTaster (classificada como benigna pelo MutationAssessor e PROVEAN).
T62	som	c.1926G>A	sinônima	1.053	G=994 A=59	G=0.944 A=0.056	não encontrada	potencializadores de splicing de exons (ESE), potencial alteração do splicing	VUS	•	•			
T62	som	c.1939C>T	<i>missense</i>	1.051	C=989 T=62	C=0.941 T=0.059	não encontrada	provavelmente não altera o splicing	VUS	•	•		•	DANN, GERP, dbNSFP.FATHMM, LRT, MetaLR, MetaSVM, MutationAssessor, MutationTaster e PROVEAN (sem predições benignas).
T64	som	c.500+46A>G	intrônica	55	A=30 G=25	A=0.545 G=0.455	não encontrada	provavelmente não altera o splicing	VUS				•	GERP (sem predições benignas)
T66	som	c.1490C>T	<i>missense</i>	230	C=219 T=11	C=0.952 T=0.048	não encontrada	alteração dos sítios potencializadores de splicing de exons (ESE), potencial alteração do splicing	VUS	•	•		•	DANN, GERP, dbNSFP.FATHMM, LRT, MetaLR, MetaSVM, MutationAssessor, MutationTaster e PROVEAN (sem predições benignas)
S80	cons	c.718+35A>T	intrônica	135	A=57 T=78	A=0.422 T=0.578	descrita em indivíduos sem câncer	provavelmente não altera o splicing	VUS					
T80	som	c.718+35A>T	intrônica	178	A=0 T=173	A=0.0 T=0.972	descrita em indivíduos sem câncer	provavelmente não altera o splicing	VUS					

Dados como sexo do paciente, idade ao diagnóstico, lateralidade do tumor e histórico familiar de retinoblastoma encontram-se na Tabela 4.6.

Tabela 4.6: Dados dos pacientes com variantes no gene *RB1* de significado incerto. fem = feminino, masc = masculino.

Paciente	Sexo	Lateralidade	Idade no diagnóstico (meses)	Primeiro sintoma	Histórico Familiar de RB
64	masc	bilateral	15	leucocoria	não
05	masc	unilateral	15	leucocoria	não
06	masc	unilateral	35	leucocoria	não
21	masc	unilateral	32	leucocoria	não
29	fem	unilateral	31	leucocoria e estrabismo	não
32	fem	unilateral	26	leucocoria	não
62	masc	unilateral	22	estrabismo	não
66	fem	unilateral	7	estrabismo	não
80	masc	unilateral	27	leucocoria	não

#### 4.2.8 Mutações com potencial patogênico em outros 159 genes associados a câncer

Foram encontradas 123 variantes (116 distintas), classificadas pelos critérios da ACMG como patogênicas ou provavelmente patogênicas e com profundidade de cobertura  $\geq 50X$ , em 14 pacientes, em 62 dos 159 genes estudados. Destes, 60 genes foram encontrados mutados somente em tumores, um gene em uma amostra de sangue e uma amostra não pareada de tumor, e apenas um gene somente em uma amostra de sangue. A distribuição dessas alterações está representada na Figura 4.25, onde a frequência em que esses genes apresentaram-se alterados é proporcional ao tamanho das suas siglas.



Figura 4.25: Genes com mutações patogênicas. O tamanho da sigla de cada gene é proporcional ao número de mutações.

Das 116 mutações patogênicas, cinco possuíam registro somente no COSMIC, 12 estavam depositadas no dbSNP, e duas em ambos bancos de dados. Deste modo, 97 novas mutações patogênicas foram identificadas neste estudo. A lista das variantes, informações adicionais e características clínico-patológicas (lateralidade do tumor, idade do diagnóstico e presença de mutação) dos pacientes que apresentaram alterações patogênicas nos genes estudados encontra-se no Anexo III. Das 116, duas eram constitutivas, em amostras de sangue de dois pacientes.

No presente estudo, dois genes previamente descritos em associação com retinoblastoma, *BCOR* (*BCL6 Corepressor*) *CREBBP* (*CREB Binding protein*) foram encontrados mutados. *BCOR* em 16,7% dos tumores (4/24), porém com frequência de mutação de 25,0% (6 mutações/24 tumores) e *CREBBP* mutado em 8,3% dos tumores (2/24), porém com frequência de mutação de 12,5% (3 mutações/24 tumores).

As mutações estavam distribuídas de forma discrepante entre as amostras tumorais com uma média de ~9 mutações/amostra. Três delas apresentaram um grande número de mutações patogênicas, correspondendo, juntas, a quase 85% (100/120) dessas alterações: 44 no T62, 25 no T06, e 21 no T21. Somente dois genes estavam alterados nessas três amostras: *MLL2* (*Histone-Lysine N-Methyltransferase*) e *NF1* (*Neurofibromatosis 1*). Em uma quarta amostra (T86) com somente seis mutações, *MLL2* também estava mutado. Nos 20 pacientes restantes não foram encontradas mutações em *MLL2* ou *NF1* no sangue ou tumor.

Quarenta e um genes encontravam-se mutados somente na presença de mutação no *MLL2* enquanto outros 17 genes (incluindo *RB1*) encontravam-se mutados independentemente da presença de mutação no *MLL2* (Figura 4.26).

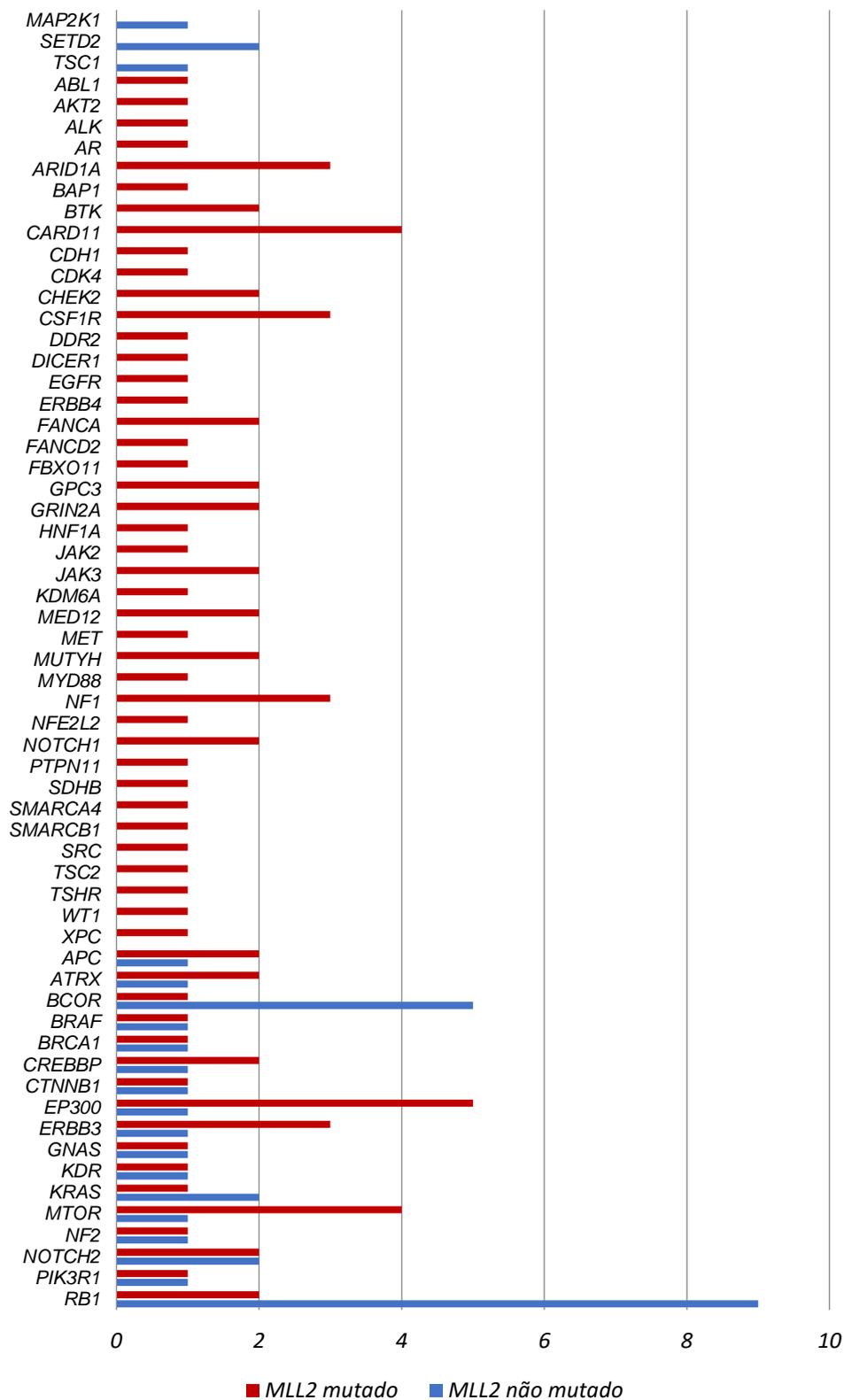


Figura 4.26: Número de mutações patogênicas em amostras com e sem o gene *MLL2* mutado

#### 4.2.9 Análise de associação entre presença de mutações nos 159 genes e presença de mutações no gene *RB1* e lateralidade do tumor

A presença de *RB1* mutado não mostrou associação à presença de mutação em outros genes ( $p = 0,320$ ). Porém, quando considerado o número de mutações nos 159 genes, foi observado que amostras com o *RB1* mutado eram portadoras de um maior número de mutações que amostras com *RB1* não mutado ( $p = 0,016$ ). Não foi observada associação entre lateralidade e presença de mutações em outros genes ( $p = 0,143$ ), porém foi observado um maior número de mutações em tumores de pacientes com apresentação unilateral ( $p < 0,001$ ).

Em relação os 61 genes que se apresentaram mutados em amostras tumorais, 18 deles apresentaram-se alterados apenas na presença de mutação no *RB1*, 30 apresentaram-se alterados apenas em casos sem mutação no *RB1*, e 13 genes apresentaram-se alterados em ambos os casos. A Figura 4.27 mostra os genes mutados com suas respectivas frequências de mutação.

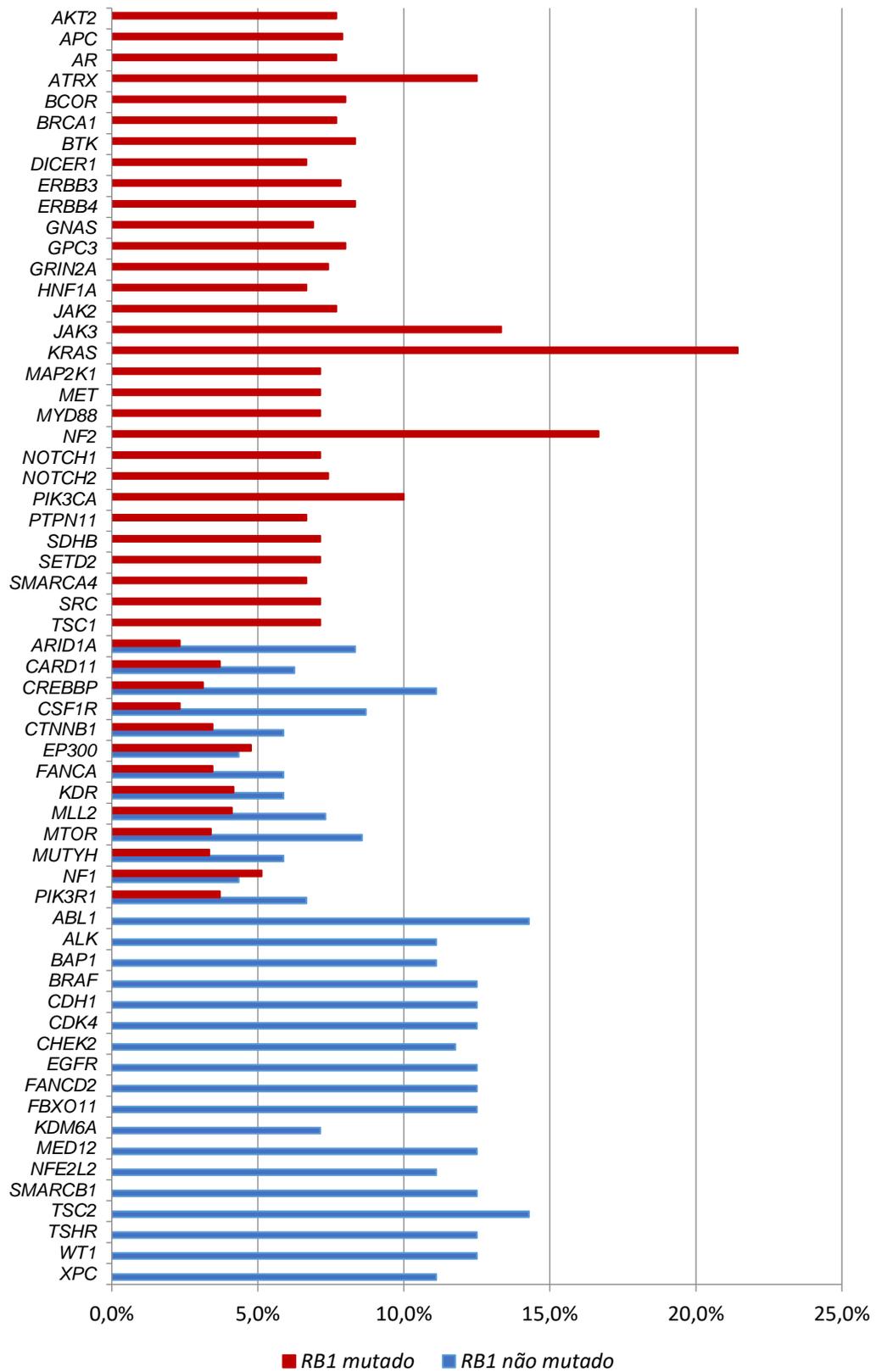


Figura 4.27: Frequência de mutações patogênicas em tumores com e sem mutação patogênica no *RB1*.

Apesar de muitos genes apresentarem frequências diferentes de mutação entre ambos os grupos (pacientes com *RB1* mutado e não mutado), somente os genes *BCOR* (*BCL6 corepressor*) e *BRAF* (*B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase*) apresentaram diferenças significativas (ambos valores de  $p = 0,050$ ). *BCOR* estava mutado exclusivamente em amostras com mutação no *RB1* e *BRAF* apenas em tumores sem mutação no *RB1*.

Em relação à lateralidade do tumor, 52/61 genes apresentaram-se alterados somente em casos unilaterais, dois apenas em casos bilaterais e sete em ambos os casos (Figura 4.28). Apenas os genes *TSC1* (*TSC complex subunit 1*) e *MAP2K1* (*Mitogen-activated protein kinase 1*) apresentaram diferenças significativas entre os grupos (ambos valores de  $p = 0,034$ ), estando mutados apenas em pacientes com apresentação bilateral.

Finalmente, sete pacientes não apresentaram mutações patogênicas nos 160 genes estudados. Em cinco deles (nº 05, nº 29, nº32, nº 41, nº 50) o tumor era unilateral e dois (nº 59, nº87) apresentavam tumor bilateral.

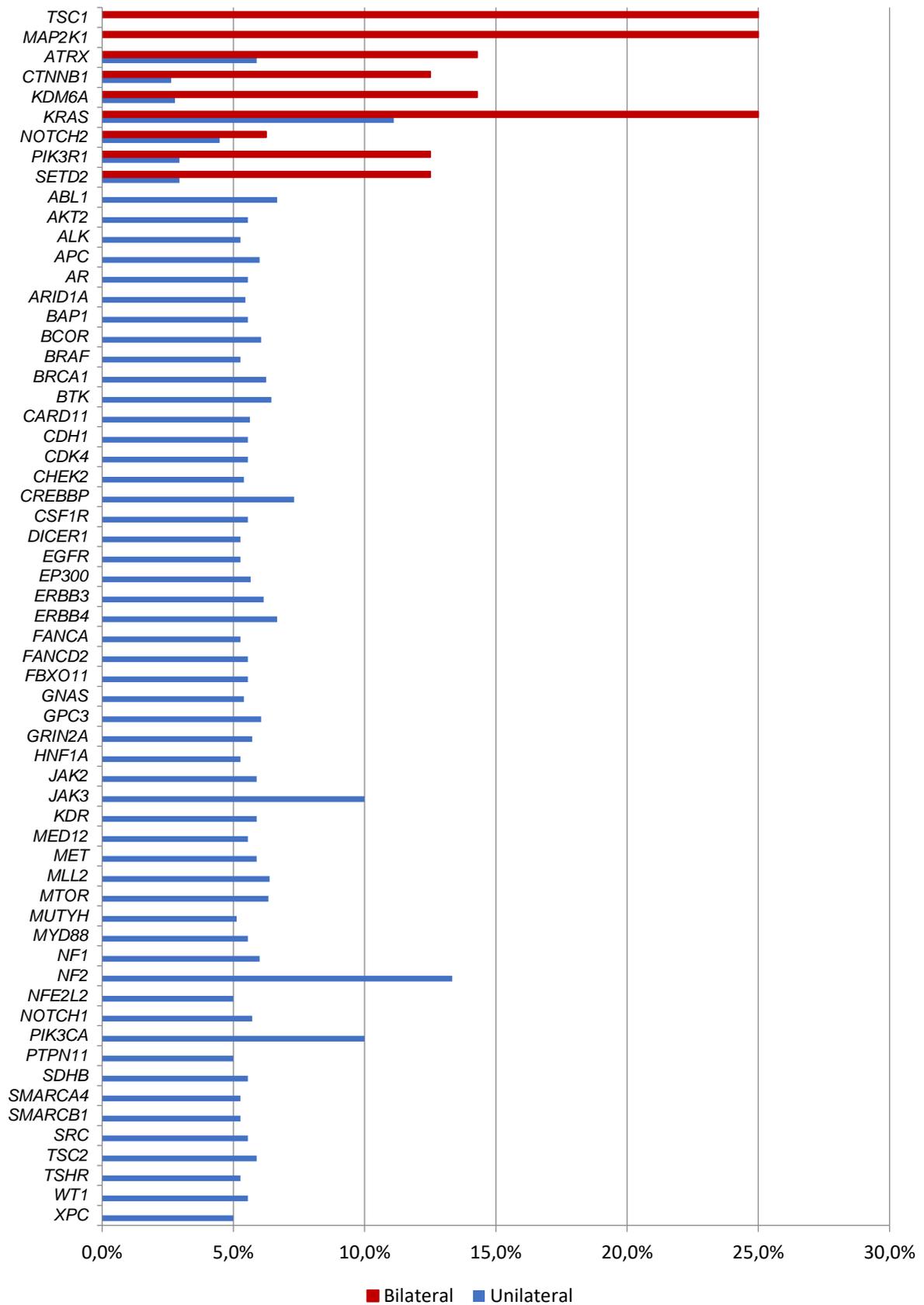


Figura 4.28: Frequência de mutações patogênicas em tumores de pacientes com apresentação uni e bilateral.

### 4.3. Análise de vias biológicas

As vias biológicas contendo genes que apresentaram mutações patogênicas foram analisadas (Figura 4.29). As 25 principais vias foram indicadas pela ferramenta “Reactome”, sendo estas listadas, juntamente com os genes na Tabela 4.7. As análises de comparação de proporções não mostraram vias com diferenças significativas na frequência de mutações em relação à presença de mutação no *RB1*. Porém, em relação à lateralidade do tumor, cinco vias apresentaram maior número de mutações em amostras de pacientes com apresentação unilateral. Foram estas: transcrição genérica ( $p = 0,033$ ), transcrição da RNA polimerase II ( $p = 0,033$ ), expressão gênica ( $p = 0,026$ ), transdução de sinal ( $p = 0,009$ ) e vias relacionadas a doenças ( $p = 0,031$ ).

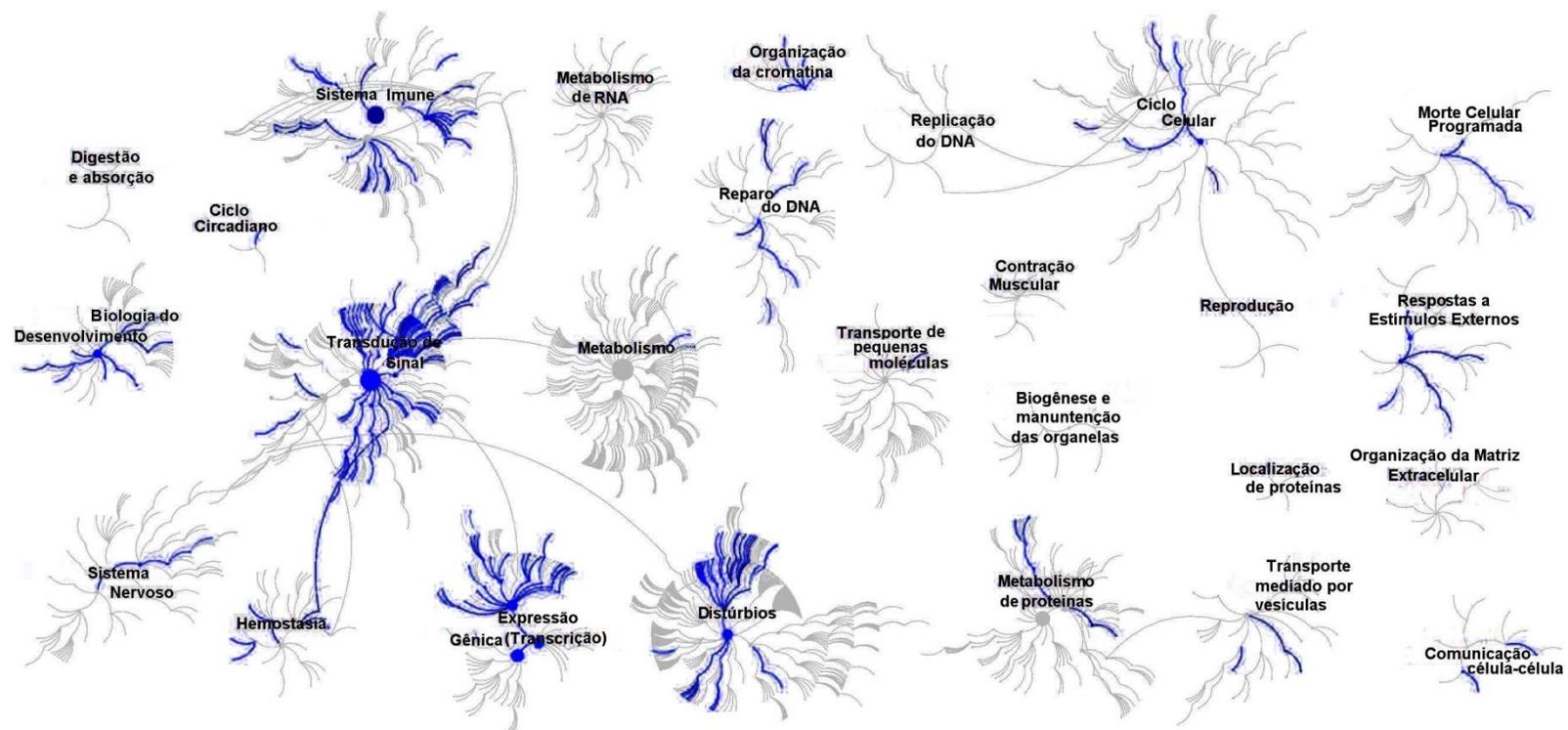


Figura 4.29: Representação geral das vias biológicas. A cor azul destaca as vias afetadas pelos genes analisados e, em cinza as vias que não foram significativamente representadas.

Tabela 4.7: Principais vias em que os genes mutados participavam.

Vias Genéricas de transcrição	<i>ABL1</i> <i>CTNNB1</i>	<i>AKT2</i> <i>EGFR</i>	<i>AR</i> <i>EP300</i>	<i>ARID1A</i> <i>FANCD2</i>	<i>BAP1</i> <i>GRIN2A</i>	<i>BRCA1</i> <i>KRAS</i>	<i>CDK4</i> <i>MED12</i>	<i>CHEK2</i> <i>MET</i>	<i>CREBBP</i> <i>MLL2</i>
Transcrição da RNA Polimerase II	<i>MTOR</i>	<i>NOTCH1</i>	<i>NOTCH2</i>	<i>PTNPN11</i>	<i>SMARCA4</i>	<i>SMARCB1</i>	<i>SRC</i>	<i>TSC1</i>	<i>TSC2</i>
Expressão gênica	<i>ABL1</i> <i>CTNNB1</i> <i>MLL2</i> <i>TSC2</i>	<i>AKT2</i> <i>DICER1</i> <i>MTOR</i>	<i>AR</i> <i>EGFR</i> <i>NOTCH1</i>	<i>ARID1A</i> <i>EP300</i> <i>NOTCH2</i>	<i>BAP1</i> <i>FANCD2</i> <i>PTNPN11</i>	<i>BRCA1</i> <i>GRIN2A</i> <i>SMARCA4</i>	<i>CDK4</i> <i>KRAS</i> <i>SMARCB1</i>	<i>CHEK2</i> <i>MED12</i> <i>SRC</i>	<i>CREBBP</i> <i>MET</i> <i>TSC1</i>
Distúrbios de transdução de sinal	<i>AKT2</i> <i>JAK2</i> <i>SRC</i>	<i>APC</i> <i>KRAS</i> <i>TSC2</i>	<i>BRAF</i> <i>MAP2K1</i>	<i>CREBBP</i> <i>MET</i>	<i>CTNNB1</i> <i>MTOR</i>	<i>EGFR</i> <i>NF1</i>	<i>EP300</i> <i>NOTCH1</i>	<i>ERBB3</i> <i>PI3KR1</i>	<i>ERBB4</i> <i>PTPN11</i>
Sinalização por <i>ERBB2</i>	<i>AKT2</i>	<i>EGFR</i>	<i>ERBB3</i>	<i>ERBB4</i>	<i>KRAS</i>	<i>PI3KR1</i>	<i>SRC</i>		
Regulação negativa da via PI3K/AKT	<i>AKT2</i>	<i>EGFR</i>	<i>ERBB3</i>	<i>ERBB4</i>	<i>MET</i>	<i>MYD88</i>	<i>PI3KR1</i>	<i>PTPN11</i>	<i>SRC</i>
Sinalização de PI3K/AKT em Cancer	<i>AKT2</i> <i>TSC2</i>	<i>EGFR</i>	<i>ERBB3</i>	<i>ERBB4</i>	<i>MET</i>	<i>MTOR</i>	<i>PI3KR1</i>	<i>PTPN11</i>	<i>SRC</i>
Transdução de sinal	<i>ABL1</i> <i>CREBBP</i> <i>JAK2</i> <i>NF2</i> <i>TSHR</i>	<i>AKT2</i> <i>CTNNB1</i> <i>KDR</i>	<i>APC</i> <i>EGFR</i> <i>KRAS</i> <i>NOTCH1</i> <i>NOTCH2</i>	<i>AR</i> <i>EP300</i> <i>MAP2K1</i> <i>PIK3R1</i>	<i>BAP1</i> <i>ERBB3</i> <i>MET</i> <i>PTPN11</i>	<i>BRAF</i> <i>ERBB4</i> <i>MLL2</i> <i>SMARCA4</i>	<i>BTK</i> <i>GNAS</i> <i>MTOR</i> <i>SRC</i>	<i>CDH1</i> <i>GPC3</i> <i>MYD88</i> <i>TSC1</i>	<i>CDK4</i> <i>JAK2</i> <i>NF1</i> <i>TSC2</i>
Sinalização por MAPK1/MAPK3	<i>BRAF</i> <i>NF1</i>	<i>EGFR</i> <i>PTPN11</i>	<i>ERBB3</i> <i>SRC</i>	<i>ERBB4</i>	<i>JAK2</i>	<i>JAK3</i>	<i>KRAS</i>	<i>MAP2K1</i>	<i>MET</i>
Sinalização por <i>ERBB4</i>	<i>EGFR</i>	<i>ERBB3</i>	<i>ERBB4</i>	<i>KRAS</i>	<i>PIK3R1</i>	<i>SRC</i>			
<i>PI5P</i> , <i>PP2A</i> e <i>IER3</i> regulando sinalização de PI3K/AKT	<i>EGFR</i>	<i>ERBB3</i>	<i>ERBB4</i>	<i>MET</i>	<i>MYD88</i>	<i>PI3KR1</i>	<i>PTPN11</i>	<i>SRC</i>	
PIP3 ativando sinalização de AKT	<i>AKT2</i>	<i>BAP1</i>	<i>EGFR</i>	<i>ERBB3</i>	<i>ERBB4</i>	<i>MET</i>	<i>MTOR</i>	<i>MYD88</i>	<i>PIK3R1</i>
Cascata de RAF/MAP quinase	<i>PTPN11</i> <i>BRAF</i> <i>NF1</i>	<i>SRC</i> <i>EGFR</i> <i>SRC</i>	<i>TSC2</i> <i>ERBB3</i>	<i>ERBB4</i>	<i>JAK2</i>	<i>JAK3</i>	<i>KRAS</i>	<i>MAP2K1</i>	<i>MET</i>
Sinalização da família de cascatas MAPK	<i>BRAF</i> <i>NF1</i>	<i>EGFR</i> <i>PTPN11</i>	<i>ERBB3</i> <i>SRC</i>	<i>ERBB4</i>	<i>JAK2</i>	<i>JAK3</i>	<i>KRAS</i>	<i>MAP2K1</i>	<i>MET</i>
Sinalização por receptor tirosina quinases	<i>AKT2</i> <i>MET</i>	<i>BRAF</i> <i>MTOR</i>	<i>CTNNB1</i> <i>PIK3R1</i>	<i>EGFR</i> <i>PTNPN11</i>	<i>ERBB3</i> <i>SRC</i>	<i>ERBB4</i>	<i>JAK2</i>	<i>KDR</i>	<i>KRAS</i>
Sinalização intracelular por segundo mensageir	<i>AKT2</i> <i>MET</i>	<i>BAP1</i> <i>MTOR</i>	<i>EGFR</i> <i>PIK3R1</i>	<i>ERBB3</i> <i>PTNPN11</i>	<i>ERBB4</i> <i>SRC</i>	<i>JAK2</i>	<i>KDR</i>	<i>KRAS</i>	
Organização da cromatina	<i>ARID1A</i> <i>SMARCB1</i>	<i>CDK4</i>	<i>CREBBP</i>	<i>EP300</i>	<i>JAK2</i>	<i>KDM6A</i>	<i>MLL2</i>	<i>SETD2</i>	<i>SMARCA4</i>
Enzimas modificadoras da cromatina	<i>ARID1A</i> <i>SMARCB1</i>	<i>CDK4</i>	<i>CREBBP</i>	<i>EP300</i>	<i>JAK2</i>	<i>KDM6A</i>	<i>MLL2</i>	<i>SETD2</i>	<i>SMARCA4</i>
Regulação de canais e receptores nervosas por <i>MECP2</i>	<i>GRIN2A</i>	<i>MET</i>	<i>NOTCH1</i>						
Doenças	<i>AKT2</i> <i>ERBB3</i> <i>MYD88</i>	<i>APC</i> <i>ERBB4</i> <i>NF1</i>	<i>BRAF</i> <i>GPC3</i> <i>NOTCH1</i>	<i>BTK</i> <i>JAK2</i> <i>NOTCH2</i>	<i>CDH1</i> <i>KRAS</i> <i>PI3KR1</i>	<i>CREBBP</i> <i>MAP2K1</i> <i>PTPN1</i>	<i>CTNNB1</i> <i>MET</i> <i>SRC</i>	<i>EGFR</i> <i>MTOR</i> <i>TSC2</i>	<i>EP300</i> <i>MUTYH</i>
Transcrição e tradução pré-NOTCH	<i>CREBBP</i>	<i>EP300</i>	<i>NOTCH1</i>	<i>NOTCH2</i>					
Eventos <i>SHC1</i> na sinalização por <i>ERBB2</i>	<i>EGFR</i>	<i>ERBB3</i>	<i>ERBB4</i>	<i>KRAS</i>					
Regulação negativa da sinalização por <i>ERBB2</i>	<i>AKT2</i>	<i>EGFR</i>	<i>ERBB3</i>	<i>ERBB4</i>					
<i>ERBB2</i> regulando a motilidade celular	<i>EGFR</i>	<i>ERBB3</i>	<i>ERBB4</i>						
<i>ERBB2</i> ativando a sinalização por <i>PTK6</i>	<i>EGFR</i>	<i>ERBB3</i>	<i>ERBB4</i>						

#### 4.4. Análise da variação do número de cópias (CNV)

A variação do número de cópias dos 160 genes do painel nas amostras tumorais foi estabelecida a partir da análise pareada das amostras de sangue e tumor de cada paciente. Todos os genes do painel apresentaram CNVs em, no mínimo, 30% das amostras tumorais, com 44% dos genes (77/160) em mais de 70% das amostras. O evento mais frequente foi amplificação, seguido de deleção em heterozigose e deleção em homozigose (Figura 4.30). Os dados de CNV para cada gene, por amostra analisada são apresentados na Figura 4.31. *CDK4* (*cyclin dependent kinase 4*) e *NFKBIA* (*NFKB inhibitor alpha*) foram os genes mais frequentemente amplificados (95,7%; em 22/23 amostras tumorais), com média aproximada de 30 e 22 cópias, respectivamente.

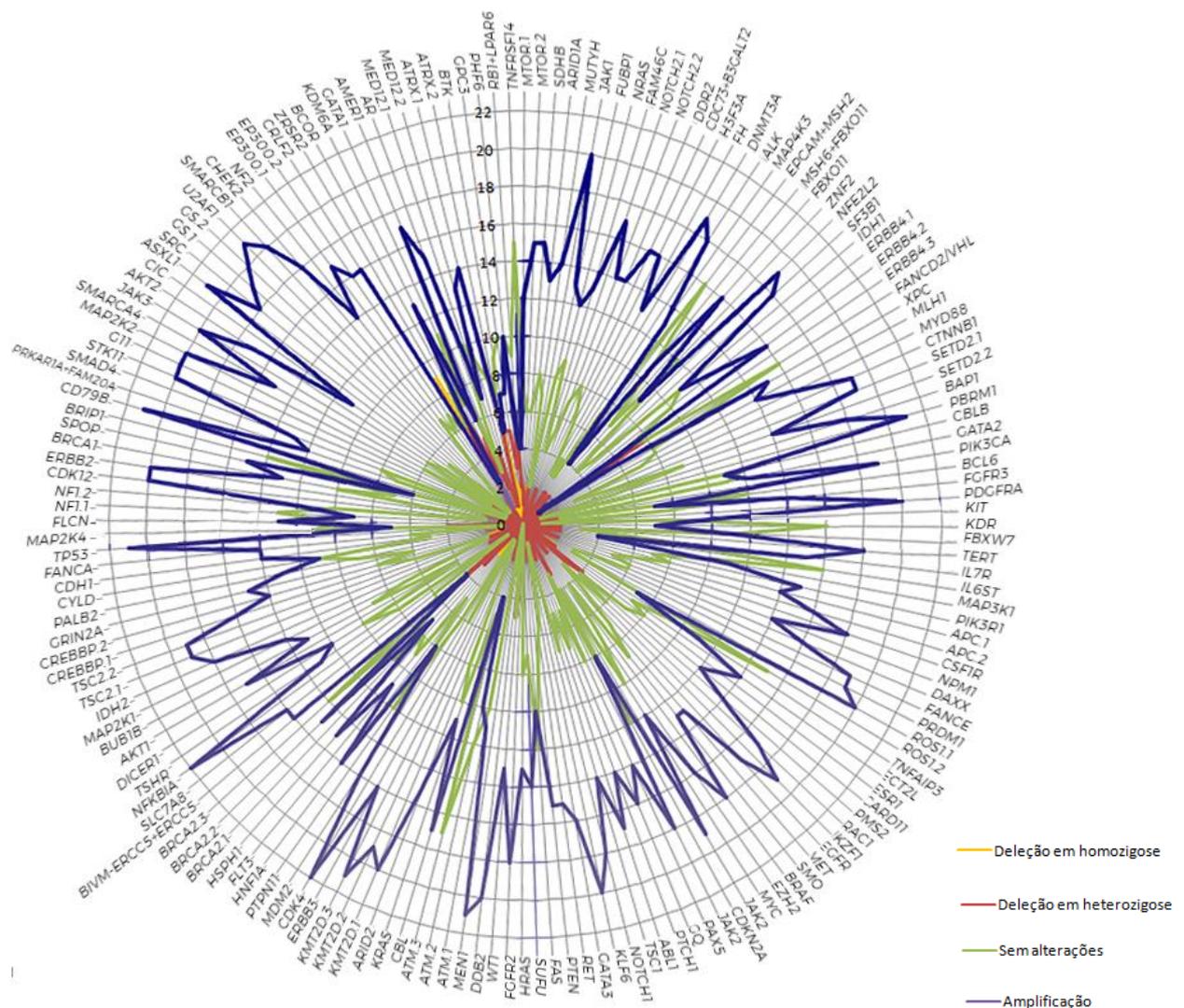


Figura 4.30: Eventos de CNV por gene analisado.



Neste estudo, os braços cromossômicos 1q, 2p e 6p não foram inteiramente analisados, porém, alguns dos genes estudados estavam localizados nestas regiões (Figura 4.32A). De fato, a amplificação nestas regiões foi o evento mais frequente, principalmente em 1q e 6p (Figura 4.32B).

*CRLF2* (*Cytokine Receptor LikeFactor 2*) foi o gene deletado com maior frequência, com perda bialélica em 43% (9/21) das amostras analisadas e ainda perda de um alelo em 24% (5/21). *PHF6* (*PHD Finger Protein 6*) também estava frequentemente deletado, com perda bialélica em 9% das amostras (2/22) e deleção em heterozigose em 27% (6/22). Adicionalmente, *ZRSR2* (*Zinc Finger CCCH-Type, RNA Binding Motif and Serine/Arginine Rich 2*) encontrou-se deletado em 30% das amostras (7/23), sempre em heterozigose, e amplificado em 30% das amostras (7/23).

Apesar do perfil heterogêneo apresentado pelos dados de CNV, 25 genes apresentaram diferenças significativas de amplificação entre amostras com e sem mutação no *RB1* (Tabela 4.8). Doze genes mostraram-se amplificados com frequências superiores a 50% nas amostras com mutação no *RB1* em relação ao grupo sem mutação no *RB1* que não mostrou amplificação desses mesmos genes. Outros 13 genes mostraram-se amplificados em ambos grupos, porém com frequências menores de 30% nas amostras com mutação no *RB1* em relação ao grupo sem mutação no *RB1* que mostrou amplificações desses mesmos genes com frequências superiores a 55%.

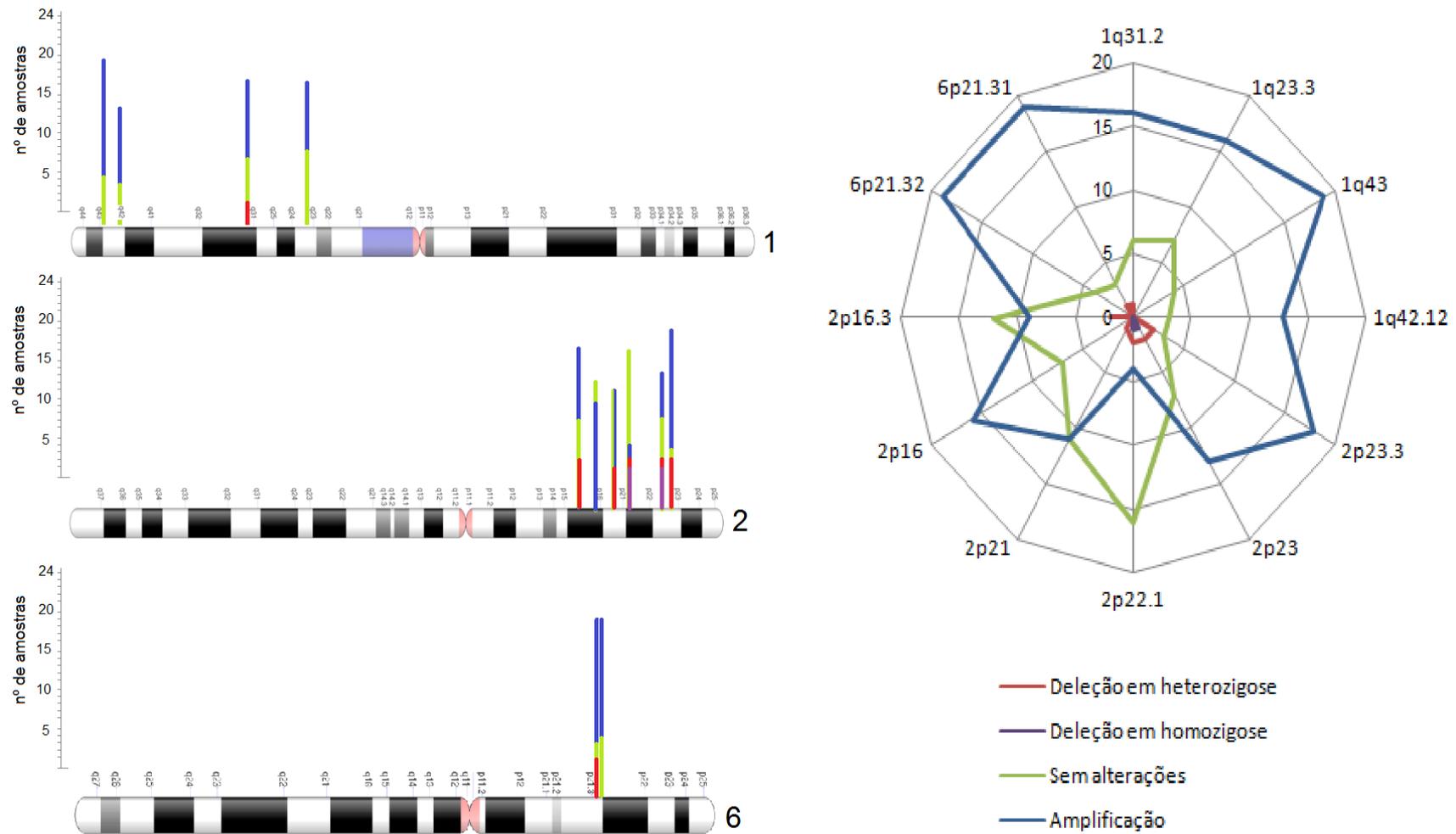


Figura 4.32:Áreas das regiões cromossômicas (1q, 2p e 6p), cuja amplificação é associada ao retinoblastoma, que foram analisadas pelo presente estudo (A) e representação gráfica dos eventos de CNV observados.

Tabela 4.8: Diferenças significativas de amplificação entre amostras tumores com o *RB1* mutado e não mutado.

Gene	Frequência em amostras com <i>RB1</i> mutado	Frequência em amostras com <i>RB1</i> não mutado	<i>p</i>
<i>GNA11</i>	100.0%	0.0%	< 0.0001
<i>HRAS</i>	100.0%	0.0%	< 0.0001
<i>KLF6</i>	100.0%	0.0%	< 0.0001
<i>STK11</i>	100.0%	0.0%	< 0.0001
<i>TP53</i>	100.0%	0.0%	< 0.0001
<i>MAP2K2</i>	92.9%	0.0%	< 0.0001
<i>TSC2.1</i>	92.9%	0.0%	< 0.0001
<i>TSC2.2</i>	85.7%	0.0%	< 0.0001
<i>FGFR3</i>	92.3%	0.0%	< 0.0001
<i>PMS2</i>	78.6%	0.0%	0.0003
<i>RAC1</i>	78.6%	0.0%	0.0005
<i>SMARCA4</i>	64.3%	0.0%	0.0026
<i>TERT</i>	57.1%	0.0%	0.0061
<i>SF3B1</i>	28.6%	77.8%	0.0242
<i>NRAS</i>	16.7%	66.7%	0.0393
<i>ZNF2</i>	14.3%	88.9%	0.0006
<i>MUTYH</i>	14.3%	77.8%	0.0029
<i>MTOR.1</i>	14.3%	55.6%	0.004
<i>MTOR.2</i>	14.3%	66.7%	0.0118
<i>NOTCH2.1</i>	14.3%	66.7%	0.0118
<i>NOTCH2.2</i>	14.3%	66.7%	0.0118
<i>ATRX.2</i>	14.3%	55.6%	0.004
<i>BTK</i>	14.3%	55.6%	0.004
<i>FUBP1</i>	14.3%	55.6%	0.004
<i>JAK1</i>	14.3%	55.6%	0.004
<i>KIT</i>	14.3%	55.6%	0.004
<i>SDHB</i>	14.3%	55.6%	0.004
<i>ZRSR2</i>	14.3%	55.6%	0.004

Análises com Reactome mostraram que os 11/12 genes amplificados somente em amostras tumorais com *RB1* mutado participavam, principalmente, de vias envolvidas na transdução de sinal, transcrição gênica, homeostase e biologia do desenvolvimento. Um dos 12 genes, *KLF6* (*Kruppel like factor 6*) não foi incluído nas análises, por não fazer parte do banco de dados da ferramenta utilizada. As vias em destaque foram:

- doenças de transdução de sinal: *FGFR3*, *RAC1*, *HRAS*, *TSC2*, *MAP2K2*
- via genérica de transcrição: *PMS2*, *TP53*, *SMARCA4*, *TSC2*, *STK11*
- regulação transcricional por *TP53*: *PMS2*, *TP53*, *STK11*, *TSC2*

- sinalização AKT ativada por *PIP3*: *FGFR3*, *TP53*, *RAC1*, *TSC2*
- cascata de sinalização da família MAPK: *FGFR3*, *MAP2K2*, *HRAS*, *RAC1*
- sinalização intracelular por segundo mensageiro: *FGFR3*, *TP53*, *RAC1*, *TSC2*
- sinalização PI3K/AKT no câncer: *FGFR3*, *RAC1*, *TSC2*

As análises com Reactome mostraram que os 11/13 genes que estavam mais frequentemente amplificados nas amostras tumorais sem mutação no *RB1* participavam, principalmente, de vias envolvidas na transdução de sinal, sistema imune, expressão gênica e vias relacionadas a doenças. Os genes *ATRX* (*ATRX chromatin remodeler*) e *FUBP1* (*Far upstream element binding protein 1*) não foram incluídos nas análises, por não fazer parte do banco de dados da ferramenta utilizada. As vias em destaque foram:

- vias relacionadas a doenças: *BTK*, *KIT*, *MTOR*, *MUTYH*, *NOTCH2*, *NRAS*
- expressão gênica (transcrição): *KIT*, *MTOR*, *NOTCH2*, *SF3B1*, *ZNF2*
- via genérica de transcrição: *KIT*, *MTOR*, *NOTCH2*, *ZNF2*
- cascata de quinases: RAF/MAP: *JAK1*, *KIT*, *NRAS*
- sinalização por MAPK1/MAPK3: *JAK1*, *KIT*, *NRAS*

Em relação a deleções, apenas a deleção dos genes *CRLF2* (*Cytokine receptor like factor 2*;  $p = 0,0002$ ) e *IL7R* (*Interleukin 7 receptor*;  $p = 0,0254$ ) foram significativamente mais frequentes em presença de mutação no *RB1*, não ocorrendo em amostras sem mutação.

Em relação à lateralidade, apenas o gene *KRAS* (*KRAS proto-oncogene, GTPase*) mostrou diferença significativa ( $p = 0,0308$ ) na frequência de amplificação entre amostras de pacientes com apresentação uni ou bilateral, sendo mais frequente em bilaterais. Quanto a deleções, apenas a deleção do gene *MET* (*MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase*) apresentou diferença significativa ( $p = 0,0339$ ) na frequência entre os dois grupos, ocorrendo exclusivamente em amostras bilaterais.

Os eventos de CNV dos 159 genes dos sete pacientes que não apresentaram mutações patogênicas foram analisados em comparação aos pacientes que apresentaram alterações patogênicas. Oito genes apresentaram-se significativamente deletados (em homo ou heterozigose) somente nas amostras tumorais sem mutações patogênicas. Foram estes: *MTOR* (*mammalian target of rapamycin*), *ARID1A* (*AT-rich interaction domain 1A*), *DNMT3A* (*DNA*

*methyltransferase 3 alpha*), *PTCH1* (*patched 1*), *SUFU* (*SUFU negative regulator of hedgehog signaling*), *MEN1* (*menin 1*), *AKT1* (*AKT serine/threonine kinase 1*), *MAP2K2* (*Mitogen-activated protein kinase kinase 2*).

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1. MLPA em amostras de sangue periférico de pacientes sem mutações patogênicas constitutivas previamente detectadas por sequenciamento de Sanger

Visando detectar grandes rearranjos, o MLPA foi utilizado para analisar o gene *RB1* em 61 amostras de sangue periférico de pacientes que não haviam apresentado alterações patogênicas por sequenciamento de Sanger. Nos 61 pacientes analisados, quatro apresentaram alterações constitutivas demonstradas por MLPA, sendo duas deleções completas do gene *RB1* e duas envolvendo apenas um exon (1 ou 3).

A maior parte das mutações constitutivas do gene *RB1* consiste em substituições de um ou poucos nucleotídeos (LOHMANN *et al.*, 1996). Porém, em alguns casos hereditários (cerca de 15%) é possível encontrar variações do número de cópias do gene *RB1* e/ou da região cromossômica 13q14 (HARBOUR, 1998; LOHMANN, 1999). Grandes deleções, assim como duplicações, encontram-se dentro das limitações do sequenciamento, principal metodologia utilizada na detecção de mutações patogênicas, mas podem ser detectadas através do MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe*), metodologia que permite a quantificação relativa de até 50 regiões de interesse em apenas uma reação de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (SCHOUTEN *et al.*, 2002).

Pacientes que apresentam deleções constitutivas de um alelo do *RB1* podem apresentar características fenotípicas relacionadas com deleções no braço longo do cromossomo 13 que resulta em uma desordem rara denominada síndrome de deleção 13q. Com exceção do retinoblastoma, as outras características fenotípicas geralmente manifestam-se quando a deleção envolve a região 13q32, levando a alterações como deficiência intelectual severo, deficiência do crescimento, microcefalia e malformações gastrointestinais ou as regiões 13q33 e 13q34 que levam ao deficiência intelectual severo, porém sem deficiência do crescimento ou grandes malformações estruturais (JONES, 1998). Apenas um dos quatro pacientes

com deleção completa do *RB1* (paciente nº 92) apresentou alguma malformação (assimetria fácil e sindactilia cutânea dos 4/5 pododáctilos), porém os dois portadores de deleção completa (pacientes nº 92 e nº 104) apresentaram atraso psicomotor acentuado.

A porção N-terminal da pRB (RbN) interage com os domínios A e B formando a estrutura necessária para a função proteica. Esta porção possui duas regiões de fosforilação de CDK que, quando fosforiladas, anulam essas interações, contribuindo para a inativação funcional da pRB (HASSLER *et al.*, 2007). Mutações na RbN são encontradas em pacientes com retinoblastoma hereditário, o que também sugere a perda de função da proteína por alterações nesta porção (YUN *et al.*, 2011). Os dois exons do gene *RB1* que se apresentaram deletados (1 e 3), fazem parte da porção N-terminal da proteína pRB (HARBOUR, 1998). A região promotora do gene *RB1* e o éxon 1 são essenciais para a transcrição gênica, e a sua perda resulta no impedimento da síntese da pRB, causando haplo-insuficiência do *RB1* (HENLEY; DICK, 2012). Com a deleção do éxon 3, possivelmente apenas a parte extrema N-terminal da proteína pRB poderia ser expressa pelo alelo deletado, impedindo a síntese da proteína funcional a partir do transcrito (SAGE *et al.*, 2000; SAVATIER, 1996).

A perda de função de um alelo do *RB1* de forma constitutiva, como detectada em quatro pacientes, resulta em 97% de risco de desenvolver retinoblastoma, além de gerar risco aumentado de desenvolvimento de tumores secundários ao longo da vida. Os descendentes destes pacientes que possuem a alteração constitutiva terão 50% de chance de herdar o alelo *RB1* mutante (CHEN *et al.*, 2012).

Três pacientes (nº 92, nº 94 e nº 104) apresentaram deleções que envolveram genes adjacentes ao *RB1*, sendo o gene *ITM2B* (*Integral Membrane Protein 2B*) afetado nestes três casos. O gene *ITM2B* está envolvido no metabolismo de proteínas  $\beta$ -amilóides e suas alterações são associadas a casos de demência por amiloidose e distrofia retiniana com disfunção retiniana interna e anormalidades de células ganglionares. Lee e colaboradores (2007) sugeriram que *ITM2B* faz parte de um conjunto de genes supressores de tumor, e que a sua deleção potencializava a perda de função de *RB1*.

Dois pacientes (nº 92 e nº 104) que apresentaram deleção completa do *RB1* também apresentaram deleção dos genes adjacentes *ENOX1* (*Ecto-NOX Disulfide-Thiol Exchanger 1*), *DLEU1* (*Deleted in lymphocytic leukemia,1*) e *PCDH8* (*Protocadherin 8*). *ENOX1* está envolvido nas vias de transporte da membrana

plasmática. Em algumas neoplasias há variação da expressão da proteína codificada por *ENOX1* quando comparada ao tecido normal, como em linfomas, gliomas e câncer renal. (<http://www.proteinatlas.org/search/enox1>, acessado em 11/05/2019). A inibição do *ENOX1* diminui a angiogênese no durante a progressão tumoral (GENG *et al.*, 2009). *RCBTB2* (*RCC1 domain-and BTB domain-containing protein 2*) está associado à condensação da cromatina e foi descrito como supressor de tumor no câncer de próstata (LATIL *et al.*, 2002; ROSS-ADAMS *et al.*, 2015).

*DLEU1* foi descrito principalmente como supressor tumoral na leucemia linfocítica crônica de células B (LIU *et al.*, 1997) e sua deleção foi detectada também em pacientes com lipoma (CREYTENS *et al.*, 2014) enquanto que *PCDH8* foi descrito como supressor tumoral no câncer de mama por Yu e colaboradores (2008) e em câncer gástrico por Zhang e colaboradores (2012). A deleção de *PCDH8* associada à deleção do gene *RB1* foi descrita como provável indicador de risco de atraso psicomotor (MITTER *et al.*, 2011; CASTÉRA *et al.*, 2013), o que é consistente com os achados de nosso trabalho, pois os dois pacientes (nº 92 e nº 104) portadores desta deleção apresentaram atraso psicomotor acentuado.

## 5.2. Identificação de mutações patogênicas em amostras pareadas

Em alguns casos de RB, a enucleação é uma forma eficiente de cura (CANADIAN RETINOBLASTOMA SOCIETY, 2009), o que torna possível a disponibilidade de amostras tumorais para identificar alterações somáticas. Por fazer parte da rotina do centro cirúrgico e pela facilidade de armazenamento, os blocos de parafina têm sido uma excelente opção para conservação do material tumoral.

Uma avaliação da integridade do DNA das amostras tumorais pela plataforma TapeStation, qPCR permitiu selecionar inicialmente 23/59 amostras para posterior análise. Uma amostra não selecionada por qPCR foi também incluída, totalizando 24/59 amostras. Após a corrida, as amostras tumorais apresentaram cobertura de 59,8% da região alvo do painel. Seis das 24 amostras tumorais apresentaram cobertura  $\leq 30\%$ . Porém foram utilizadas para análise posteriores por apresentarem cobertura do gene *RB1* e de outros genes do painel, sendo possível identificar variantes.

Foram identificadas 136 variantes patogênicas, 116 delas com frequências alélicas inferiores a 20%, que possivelmente estariam fora dos limites de detecção

do sequenciamento de Sanger. A identificação de variantes somáticas de baixa frequência é de grande importância, pois são descritas com associação à resistência a terapias alvo (SCHMITT; LOEB; SALK, 2016), formando subclones resistentes capazes de proliferar e causar recidiva do tumor.

### 5.2.1 Alterações patogênicas no *RB1* detectadas por NGS

Em 11/24 amostras tumorais, foram encontradas 13 mutações patogênicas no *RB1* com profundidade de cobertura superior a 50X. As mutações patogênicas compreendiam 10 substituições de único nucleotídeo (SNP), uma deleção de uma base, e uma inserção de cinco bases.

Duas mutações patogênicas, c.1960+1G>T e c.763C>T, detectadas, respectivamente, em amostras tumorais dos pacientes nº 03 e nº 80, ambos com apresentação unilateral do tumor, foram também encontradas nas suas amostras pareadas de sangue. Estas alterações constitutivas não haviam sido previamente observadas nas amostras de sangue por sequenciamento de Sanger. Ainda que as frequências alélicas estimadas para essas duas variantes pelo NGS fossem altas (34% e 40%), e estivessem na faixa considerada de heterozigose, os eletroferogramas sugeriram, por mostrarem picos diferentes entre os alelos, casos de mosaïcismo, estimado em 3,8% dos casos unilaterais (RUSHLOW *et al.*, 2009). Este ocorre devido a mutações pós-zigóticas no *RB1*, que geram frequências inferiores às esperadas em heterozigose (50%). As mutações que ocorrem tardiamente no desenvolvimento podem apresentar frequências baixas, sendo de difícil identificação pelo sequenciamento de Sanger (BARBOSA *et al.*, 2013; ROHLIN *et al.*, 2009; SIPPEL *et al.*, 1998), no entanto podem ser facilmente detectadas pelo NGS.

As variantes constitutivas encontradas em heterozigose nas amostras de sangue dos pacientes nº 03 e nº 80 (c.1960+1G>T e c.763C>T), apresentaram-se em homozigose nas amostras tumorais pareadas. As diferentes frequências das mutações entre sangue e tumor foram atribuídas à perda de heterozigose (*loss of heterozygosity* - LOH), com perda do alelo normal e conservação do alelo mutado, que ocorre em cerca de 70% dos casos de retinoblastoma (CAVENEY *et al.*, 1985; ZHU *et al.*, 1992). Nos pacientes nº 13 e nº 16 a frequência do alelo mutado foi superior a 90%, sugerindo também perda de heterozigosidade.

Em relação à CNV do *RB1*, foram encontradas cinco deleções completas, duas em homozigose e três em heterozigose, e quatro ampliações completas do *RB1* em amostras tumorais. Todas as deleções foram consideradas como alterações patogênicas em vista que o *RB1* é um supressor tumoral, sendo a tumorigênese relacionada à sua perda de função. Por outro lado, as quatro ampliações completas não foram consideradas como patogênicas pela falta de informações a respeito da perda de função do *RB1* por aumento do número de cópias.

Como a estimativa de CNV por NGS foi estabelecida através de comparações de dados de tipos diferentes de tecido (sangue e tumor em parafina) e reações de PCR, os resultados poderiam não serem fidedignos. Por este motivo, foi realizada a validação por MLPA de 10 achados de CNV do gene *RB1* obtidas por NGS para determinar a confiabilidade dos achados do NGS. Os resultados mostraram compatibilidade entre NGS e MLPA e as cinco deleções somáticas completas do gene *RB1* foram validadas (*vide* Descrição de casos).

Análise do gene *RB1* por NGS mostrou alterações patogênicas em 15/24 pacientes. Não foram encontradas associações significativas entre sexo, lateralidade, primeiro sintoma, histórico familiar de RB ou idade no diagnóstico e presença de mutação no gene *RB1*.

### 5.2.2 Variantes do *RB1* de significado incerto (VUS)

Em 8/24 amostras tumorais e 4/24 amostras de sangue foram encontradas 15 variantes do gene *RB1* de significado incerto, quatro constitutivas e 11 somáticas, compreendendo 13 diferentes. Três variantes constitutivas não foram identificadas nas amostras tumorais pareadas devido à baixa cobertura.

Uma VUS constitutiva foi classificada como deletéria por três algoritmos de predição de patogenicidade e quatro somáticas foram classificadas como deletérias pelo menos por oito diferentes algoritmos. Uma VUS constitutiva e cinco VUS somáticas apresentaram possível impacto no *splicing* após análise na plataforma *Human Splicing Finder* (HSF). As demais variantes não apresentaram indícios de possível patogenicidade.

### 5.2.3 Resumo da análise do RB1

Uma avaliação conjunta das alterações encontradas no gene *RB1* é mostrada na Tabela 5.1.

Tabela 5.1: Alterações do gene *RB1* após análise com painel. Em negrito, mutações patogênicas em homozigose .

Paciente	Amostra	Alteração	Tipo de alteração	Frequência Alélica (%)	
				Normal	Mutado
3	S03	c.1960+1G>T	Patogênica	G=0.601	T=0.399
	T03			G=0.0	<b>T=0.961</b>
5	T05	c.1714C>T	VUS com potencial patogênico	C=0.951	T=0.049
6	T06	deleção	CNV	em heterozigose	
		c.2673C>T	VUS	C=0.953	T=0.047
13	T13	c.2034_c.2035insATCA	Patogênica	T=0.081	<b>TATCA=0.916</b>
16	T16	c.1215+1G>A	Patogênica	G=0.077	<b>A=0.923</b>
21	T21	c.380+1G>A	Patogênica	G=0.929	A=0.071
		c.718+28C>T	VUS	C=0.956	T=0.044
		c.2398C>T	VUS com potencial patogênico	C=0.948	T=0.052
29	T29	c.2106+24T>G	VUS	C=0.536	G=0.464
31	T31	c.1901C>G	Patogênica	C=0.776	G=0.224
32	S32	c.2106+24T>G	VUS	C=0.507	G=0.493
37	T37	c.2106+1G>T	Patogênica	G=0.769	T=0.231
		deleção	CNV	em homozigose	
46	T46	deleção	CNV	em heterozigose	
58	T58	deleção	CNV	em heterozigose	
60	T60	c.1498+2T>G	Patogênica	T=0.651	G=0.335
	S62	c.1461G>A	VUS	G=0.95	A=0.05
62	T62	c.2490-3C>G	VUS com potencial patogênico	C=0.542	G=0.458
		c.1835C>T	VUS com potencial patogênico	C=0.942	T=0.058
		c.1926G>A	VUS com potencial patogênico	G=0.944	A=0.056
		c.1939C>T	VUS	C=0.941	T=0.059
64	T64	c.500+46A>G	VUS	A=0.545	G=0.455
		c.1218_1219del	Patogênica	CT=0.564	C=0.433
66	T66	c.1490C>T	VUS com potencial patogênico	C=0.952	T=0.048
		deleção	CNV	em heterozigose	
75	T75	c.2106+1G>T	Patogênica	G=0.84	T=0.16
		deleção	CNV	em homozigose	
80	S80	c.763C>T	Patogênica	C=0.658	T=0.342
	T80	c.763C>T	Patogênica	C=0.0	<b>T=0.976</b>
86	T86	c.2106+1G>T	Patogênica	G=0.444	T=0.552

Os dados desta tabela permitiram as seguintes considerações:

- As mutações patogênicas encontradas somente nas amostras tumorais eram verdadeiramente somáticas, pois as mesmas regiões dessas mutações tiveram cobertura satisfatória nas amostras pareadas de sangue onde não foram encontradas mutações.

- As mutações patogênicas em homozigose provavelmente devem-se a perda de heterozigosidade (LOH). Uma prova de LOH requereria análise de microssatélite não realizada neste trabalho.

- Nos pacientes nº 21, nº 31, nº 37, nº 70 e nº 75 foram encontradas mutações patogênicas de baixa frequência no tecido tumoral. Este achado poderia ser devido a presença de um excesso de tecido normal nas amostras utilizadas, que foram obtidas de blocos contendo a totalidade do globo ocular.

- Uma mesma mutação patogênica (c.2106+1G>T) foi detectada em amostras tumorais dos pacientes nº 37 e nº 75 que também apresentavam deleção completa do gene *RB1* em homozigose. Esta mutação também foi encontrada na amostra tumoral de paciente nº 86 que não apresentava deleção do gene *RB1*. Esta deleção poderia estar relacionada à perda alélica nos pacientes nº 37 e nº 75. No paciente nº 86 a perda alélica poderia não ter ocorrido devido ao curto tempo de progressão do tumor diagnosticado aos cinco meses de idade em contraste com os pacientes nº 37 e nº 75 diagnosticados, respectivamente, ao 10 e 25 meses de idade.

#### 5.2.4 Mutações em outros 159 genes

Foram encontradas 123 mutações patogênicas (116 distintas) com profundidade de cobertura  $\geq 50X$ , compreendendo 97 não previamente descritas, em 62 dos 159 genes estudados. Destes, 60 genes foram encontrados mutados nas amostras tumorais, um outro gene em uma amostra de sangue e em uma amostra não pareada de tumor, e outro gene somente em uma amostra de sangue. As regiões dos genes exclusivamente mutados nas amostras de sangue tiveram profundidade de cobertura satisfatória nas amostras pareadas de tumor onde não foram encontradas mutações. É importante ressaltar que as mutações constitutivas encontradas nessas amostras de sangue apresentavam frequências inferiores a 13% o que indica que o tumor poderia ter surgido de células sem essas mutações.

Em pacientes com RB, apesar da perda de função do *RB1* no tumor, a estabilidade do genoma tumoral é geralmente mantida, e alterações somáticas em outros genes são raras e limitadas a CNVs (KOOI *et al.*, 2016). Os genes mais frequentemente afetados no RB são *BCOR* (*BCL6 Corepressor*) e *CREBBP* (*CREB Binding Protein*), com frequências de 10-13% e 4%, respectivamente (MURPHREE; TRICHE, 2012; KOOI *et al.*, 2016). Concordante com a literatura, *BCOR* foi encontrado mutado no presente estudo, em 16,7% dos tumores (4/24), porém com

frequência de mutação de 25,0% (6 mutações/24 tumores). A proteína sintetizada por *BCOR* bloqueia a ação do gene *BCL6*, um repressor transcricional de centenas de genes relacionados à detecção de danos no DNA, proliferação celular e *checkpoint* com capacidade de influenciar a apoptose (HUYNH *et al.*, 2000; CARDENAS *et al.*, 2017). *CREBBP* foi encontrado mutado em 8,3% dos tumores (2/24), porém com frequência de mutação de 12,5% (3 mutações/24 tumores). *CREBBP* codifica uma proteína da classe das histonas acetiltransferases, e potencializa a expressão de seus alvos através diversos fatores de transcrição, sendo fundamental para desenvolvimento embrionário, controle de crescimento e homeostase (TANG *et al.*, 2016).

Apesar da descrita estabilidade do retinoblastoma, três pacientes apresentaram um grande número de mutações patogênicas, correspondendo, juntos, a quase 85% dessas alterações coexistindo com mutações em *MLL2* (*Histone-Lysine N-Methyltransferase*) e *NF1* (*Neurofibromatosis 1*). *MLL2* (*KMT2D; Histone-lysine N-methyltransferase 2D*) codifica uma proteína do tipo histona-lisina N-metiltransferase capaz de controlar diretamente a expressão gênica por remodelamento da cromatina através de modificação da lisina 4 da histona H3 por transferência de um grupo metil (FROIMCHUK; JANG; GE, 2017). *NF1* é um supressor tumoral regulador negativo da família Ras, que faz parte de uma via de sinalização que estimula o crescimento celular e transcrição de genes para progressão do ciclo celular (PELTONEN; KALLIONPÄÄ; PELTONEN, 2017).

A inativação do *MLL2* é descrita como causa de estresse de transcrição que resulta em alterações genômicas (mutações pontuais ou ganhos e perdas de regiões genômicas) e instabilidade cromossômica, o que pode explicar o acúmulo de mutações nas amostras que apresentaram mutação neste gene (KANTIDAKIS *et al.*, 2016). Em um quarto paciente (nº 86) foi identificada uma mutação patogênica no *MLL2*, porém com apenas seis mutações em outros genes. O baixo número de mutações associadas neste paciente pode ser explicado pelo curto tempo para acúmulo da instabilidade genômica em vista do diagnóstico mais precoce (aos sete meses de idade) que para os outros pacientes com o gene *MLL2* mutado (nº 6 aos três anos, nº 21 e nº 62 aos dois anos).

Enquanto mutações patogênicas podem ter ocorrido aleatoriamente por instabilidade genômica causada por mutações no *MLL2*, mutações que ocorreram em ambos os grupos (com ou sem mutação no *MLL2*) sugerem 17 genes cujas alterações são essenciais para o desenvolvimento do RB (*RB1*, *PIK3R1*

(*phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 1*), *NOTCH2* (*notch receptor 2*), *NF2* (*neurofibromin 2*), *MTOR* (*mechanistic target of rapamycin kinase*), *KRAS* (*KRAS proto-oncogene, GTPase*), *KDR* (*kinase insert domain receptor*), *GNAS* (*GNAS complex locus*), *ERBB3* (*erb-b2 receptor tyrosine kinase 3*), *EP300* (*E1A binding protein p300*), *CTNNB1* (*catenin beta 1*), *CREBBP* (*CREB binding protein*), *BRCA1* (*Breast Cancer 1*), *BRAF* (*B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase*), *BCOR* (*BCL6 corepressor*), *ATRX* (*ATRX chromatin remodeler*), *APC* (*APC regulator of WNT signaling pathway*).

#### 5.2.5 Associação entre presença de mutação no *RB1*, presença de mutação em outros genes e lateralidade

A perda de função do *RB1* durante o desenvolvimento da retina é causa de instabilidade genômica (BREMNER; CHEN; PACAL, 2004; DIMARAS *et al.*, 2008) apesar que o retinoblastoma apresenta um genoma relativamente estável em comparação com a maioria dos tumores (PAPPAS *et al.*, 2017). Propõe-se que essa instabilidade inicial é neutralizada no tumor através da inibição da proteína PTTG1 (*PTTG1 regulator of sister chromatid separation, securin*) que participa do *checkpoint* da mitose mediado por *TRβ1* (*thyroid hormone receptor beta 1*) e *TRβ2* (*thyroid hormone receptor beta 2*) que regulam a tumorigênese (PAPPAS *et al.*, 2017). Porém, mutações ainda devem ocorrer para progressão do retinoma, o precursor benigno, para retinoblastoma.

Os achados deste estudo mostraram que a presença de mutação no *RB1* não estava associada à presença de mutações em outros genes, mas estava associada a um maior número de mutações em outros 159 genes. Análise de associação entre presença de mutação no *RB1* e em outros genes mostrou apenas duas associações significativas: os genes *BCOR* e *BRAF* (*B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase*) apresentaram-se mutados exclusivamente em amostras com *RB1* mutado. Apesar do *BCOR* possuir associação à malignidade (retinoblastoma) descrita na literatura, nenhum estudo analisou a sua relação direta com a presença de mutação no *RB1*. No entanto, como 90% dos casos de retinoblastoma apresentam o *RB1* mutado, é possível que esta associação (*BCOR-RB1* mutados) estivesse implícita nestes trabalhos.

*BRAF* encontra-se mutado em aproximadamente 7% das neoplasias. A substituição de um único aminoácido é suficiente para sua ativação oncogênica que

induz aumento da proliferação das células cancerígenas (DHOMEN; MARAIS, 2007; ANDREU-PEREZ *et al.*, 2011). Mutações no *BRAF* não foram inicialmente detectadas em retinoblastoma (COHEN *et al.*, 2008), mas este mesmo estudo apontou que mutações em *BRAF* ou nos genes da família RAS (*HRAS*, *NRAS*, *KRAS*) são mutuamente exclusivas por ativarem a via MEK / ERK e que a presença de um gene mutado torna o outro redundante. Concordante com estes achados, no presente estudo as amostras que apresentaram mutação no *BRAF* não apresentaram mutações nos genes da família RAS e vice-versa, o que indica que a via em que participam pode participar da progressão do retinoblastoma. A via MEK / ERK regula diversos fatores de transcrição que induzem a expressão de genes necessários para sobrevivência e proliferação celular (MONTAGUT; SETTLEMAN, 2009).

Em relação à lateralidade, não foi observada associação entre lateralidade e presença de mutação nos 159 genes, mas um maior número de mutações foi encontrado em tumores de pacientes com apresentação unilateral, sendo esta diferença significativa ( $p < 0,001$ ). Esta diferença pode se dever ao baixo número (= 4) de pacientes com apresentação bilateral em relação ao número de pacientes com apresentação unilateral (= 20), assim como a possível heterogeneidade dos tumores unilaterais que abrangem os casos com *RB1* mutado, *RB1* não mutado e com amplificação de *NMYC* (RUSHLOW *et al.*, 2013; SOLIMAN *et al.*, 2017)

Na análise de associação entre lateralidade e presença de mutação em outros genes, somente duas associações significativas foram encontradas: os genes *TSC1* (*TSC complex subunit 1*) e *MAP2K1* (*Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 1*) foram encontrados mutados apenas em casos bilaterais. Na apresentação bilateral do retinoblastoma a presença de uma alteração constitutiva no *RB1* é consensualmente postulada. Porém, não foram encontradas mutações patogênicas constitutivas nas amostras dos quatro pacientes com apresentação bilateral analisados neste estudo. Isso não exclui a possibilidade que perdas de função do *RB1* possam ter ocorrido por fatores epigenéticos ou de interação gênica não testados nestes pacientes.

Tanto a perda de função do *RB1* quanto do *TSC1* é responsável por induzir estresse energético nas células, e a perda de função de ambos os genes potencializa este efeito, induzindo a desregulação da fase S do ciclo celular e gerando danos ao DNA, principalmente por quebras de dupla fita (GORDON *et al.*,

2013). A perda de função do gene *TSC1* pode estar relacionada a tumorigenese nos casos bilaterais ao potencializar os efeitos da falta de um alelo funcional do *RB1*.

*MAP2K1* participa de diversos processos celulares que envolvem proliferação, diferenciação e regulação transcricional. É encontrado alterado em cerca de 1.16% dos tumores, sendo mutações os eventos mais frequentes, em 0,25% dos casos (AACR PROJECT GENIE CONSORTIUM, 2017). O único estudo sobre mutações neste gene e retinoblastoma relata uma deleção em heterozigose em uma linhagem celular de retinoblastoma com mutação patogênica em ambos os alelos do *RB1* sem especificar o efeito deste achado (SCHWERMER *et al.*, 2019).

#### 5.2.6 Pacientes sem alterações patogênicas no *RB1* e sem mutações nos outros 159 genes

Sete pacientes não apresentaram mutações patogênicas nos 160 genes estudados. Em cinco deles (nº 05, nº 29, nº32, nº 41, nº 50) o tumor era unilateral e dois (nº 59, nº87) apresentavam tumor bilateral. O fato de terem desenvolvido retinoblastoma deve estar relacionado a outros fatores como amplificação de *NMYC* nos casos unilaterais, fatores epigenéticos e eventos pós-transcricionais do gene *RB1*. No caso dos pacientes nº 29 e nº32, a baixa cobertura da região alvo do painel pode ser responsável pela aparente ausência de mutações. Os eventos de CNV dos outros 159 genes destes sete pacientes que não apresentaram mutações foram analisados em comparação ao pacientes restantes que apresentaram alterações patogênicas. Oito genes apresentaram-se deletados (em homo ou heterozigose) somente nas amostras sem mutações o que indica que podem ser essenciais para o desenvolvimento do retinoblastoma na presença do *RB1* funcional. Foram estes: *MTOR* (*mammalian target of rapamycin*), *ARID1A* (*AT-rich interaction domain 1A*), *DNMT3A* (*DNA methyltransferase 3 alpha*), *PTCH1* (*patched 1*), *SUFU* (*SUFU negative regulator of hedgehog signaling*), *MEN1* (*menin 1*), *AKT1* (*AKT serine/threonine kinase 1*), *MAP2K2* (*Mitogen-activated protein kinase kinase 2*).

Dentre esses, seis são descritos com associação da sua perda de função com a iniciação de neoplasias. *ARID1A* é supressor tumoral e cuja perda é capaz de alterar a expressão gênica e é descrita por desencadear tumorigênese no cancer colorretal (NAGL *et al.*, 2005). *DNMT3A* é descrito por contribuir com a iniciação da leucelima linfoblástica aguda em presença de *KRAS* oncogênico (CHANG *et al.*, 2017). Em contraste, nosso estudo não identificou mutações patogênicas em *KRAS*

nos pacientes com perda do *DNMT3A*. *PTCH1*, assim como *SUFU* tem sua perda de função relacionada à indução da via de *hedgehog* independente de ligantes (BALLATORI; HINDS, 2016; PELLEGRINI *et al.*, 2017). Evidências da ativação desta via por *PITCH1* no início do desenvolvimento do tumor foi relatada em carcinomas basocelulares e meduloblastoma (GUPTA; TAKEBE; LORUSSO, 2010; KONG; HINDS, 2012). *SUFU* é relatado com associação à predisposição para meduloblastoma na infância (TAYLOR *et al.*, 2002). A ausência do *MEN1* reduz fortemente a expressão pós-transcricional de *RB1*(IVO *et al.*, 2011). As vias desses genes são diretamente conectadas, o que reforça os indícios de uma potencial participação na tumorigênese do retinoblastoma pela sua interação direta com o *RB1*.

### 5.2.7 Análise de vias biológicas dos genes mutados

A maior parte dos genes (37/57) com mutações patogênicas faziam parte de vias de transdução de sinal. Essas vias podem controlar eventos como crescimento, divisão, morte celular e motilidade que, quando desregulados, podem favorecer a proliferação celular descontrolada e o escape dos mecanismos que controlam sobrevivência e a migração celular, resultando em vantagens seletivas para formação e progressão tumoral. Mutações que ativam oncogenes podem causar hiperativação dessas vias, enquanto a inativação dos supressores tumorais podem eliminar reguladores negativos (SEVER; BRUGGE, 2015).

Neste estudo, outras vias frequentemente afetadas encontravam-se relacionadas a transcrição gênica. Consistente com a literatura, mutações nestas vias, geralmente as capazes de potencializá-las, são encontradas em células tumorais. Elas são necessárias para a progressão tumoral, sendo cogitadas como alvo de terapias anti-tumorais (VILLICAÑA; CRUZ; ZURITA, 2014). Outras vias muito representadas neste estudo estavam relacionadas ao sistema imune e suas possíveis atividades pró ou anti-tumorais. Mutações nessas vias foram descritas por terem relações diretas com o contexto imunológico do tumor, que apresenta grande variedade entre tipos de câncer. Alterações em genes *drivers* da tumorigênese são capazes de modular o meio imunológico tumoral (WELLENSTEIN; VISSER, 2018).

Cinco vias apresentaram maior número de mutações em tumores de pacientes com apresentação unilateral, transcrição genérica ( $p = 0,033$ ), transcrição da RNA polimerase II ( $p = 0,033$ ), expressão gênica ( $p = 0,026$ ), transdução de sinal ( $p =$

0,009) e vias relacionadas a doenças ( $p = 0,031$ ). No entanto, mais estudos seriam necessários para entender as diferenças entre os mecanismos necessários de progressão e manutenção tumoral em casos uni e bilaterais.

### 5.3. Análise da variação de número de cópias (CNV) em 159 genes

Para as amostras tumorais, foi analisada por NGS a CNV dos genes do painel, pois a variação somática do número de cópias é um evento frequente em tumores sólidos que pode contribuir com a progressão tumoral por interferir nos níveis de expressão gênica (ALBERTSON, 2006). Neste estudo, todos os genes do painel apresentaram CNVs em, no mínimo, 30% das amostras tumorais, com 44% dos genes (77/160) em mais de 70% das amostras. De fato, o painel utilizado foi direcionado a análise de genes previamente descritos em outras neoplasias humanas, provavelmente participantes de vias oncogênicas e/ou fundamentais para desenvolvimento e progressão tumoral. A composição do painel justifica a alta frequência de alterações em todos os genes.

No presente estudo, o evento mais frequente de CNV foi a amplificação. A amplificação é comum em tumores e tem sido útil na identificação de novos oncogenes, assim como no diagnóstico, prognóstico, resposta a terapias e desenvolvimento de resistência (ALBERTSON, 2006). No presente estudo, *CDK4* (*cyclin dependent kinase 4*) e *NFKBIA* (*NFkB inhibitor alpha*) foram mais frequentemente amplificados (95,7%; em 22/23 amostras tumorais), com média aproximada de 30 e 22 cópias, respectivamente. A amplificação de *CDK4* é comum em diversos tipos de câncer, incluindo tumores ósseos e de tecidos moles (KANOE *et al.*, 1988; KNUDSEN; WITKIEWICZ, 2017). No lipossarcoma, esta amplificação é apontada como um evento *driver* devido à frequência em que ocorre nesta neoplasia (KNUDSEN; WITKIEWICZ, 2017). Em glioblastomas a via do *RB1* encontra-se inativa em todos os casos e a amplificação de *CDK4* é um dos mecanismos responsáveis por esta inativação (KOOI *et al.*, 2016). *NFKBIA* também se encontra amplificado em diversas neoplasias, principalmente no adenocarcinoma de pulmão (cBioPortal: CERAMI *et al.*, 2012; COMAS *et al.*, 2013), porém não há informações a respeito desta amplificação no retinoblastoma, do seu potencial como *driver* da tumorigênese ou da interação do gene *NFKBIA* com o *RB1*.

Muitos genes são frequentemente amplificados em tumores, como *EGFR* (*Epidermal Growth Factor Receptor*), *ERBB2* (*Human Epidermal Growth Factor Receptor-type 2*) – também conhecido como *HER2* – e *NMYC* (*V-Myc Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Neuroblastoma Derived Homolog*) (ALBERTSON, 2006). No presente estudo, o *EGFR* apresentou-se amplificado em 56,5% dos tumores (13/23) e *ERBB2* em 87% (20/23). A amplificação de *NMYC* não foi analisada por este gene não estar incluído no painel utilizado. Sua amplificação é bem estabelecida em retinoblastoma, sendo inclusive associada à tumorigênese em aproximadamente 1,4% destes tumores. Foi também descrita como essencial para o crescimento e proliferação das células do retinoblastoma, por estar presente independente da perda de função do *RB1* (RUSHLOW *et al.*, 2013).

Regiões cromossômicas como 1q, 2p e 6p são frequentemente amplificadas no retinoblastoma e parecem ser típicas desta neoplasia, não sendo observadas em outros tipos de câncer (ZACK *et al.*, 2013). Neste estudo, esses braços cromossômicos não foram inteiramente analisados, porém, alguns dos genes estudados estavam localizados nestas regiões. De fato, a amplificação nestas regiões foi o evento mais frequente, principalmente em 1q e 6p.

Em relação a deleções, *CRLF2* (*Cytokine Receptor Like Factor 2*) foi o gene deletado com maior frequência, apresentando perda bialélica em 43% (9/21) das amostras analisadas e ainda perda de um alelo em 24% (5/21). *CRLF2* apresenta-se alterado em 0,61% dos casos de câncer em geral, tendo a maior prevalência das alterações no câncer de ovário, pulmão (não pequenas células), mama, melanomas e sarcomas. Das alterações registradas, 0,49% corresponderam a perda deste gene e 0,11% a sua amplificação (AACR PROJECT GENIE CONSORTIUM, 2017). No presente estudo, apenas um caso, correspondente a 5% das amostras analisadas, apresentou amplificação de *CRLF2*.

Neste estudo, *PHF6* (*PHD Finger Protein 6*) foi encontrado frequentemente deletado, com perda bialélica em 9% das amostras (2/22) e deleção em heterozigose em 27% (6/22). Na literatura, este gene é reportado com baixa frequência de CNV em câncer, com exceção de amostras tumorais do trato urinário com alta frequência de amplificação. As mais altas frequências de deleção do *PHF6* foram observadas em câncer de esôfago, ovário e endométrio, no entanto todas inferiores a 5% (HAJJARI *et al.*, 2015).

Neste estudo, o gene *ZRSR2* (*Zinc Finger CCCH-Type, RNA Binding Motif and Serine/Arginine Rich 2*) encontrou-se deletado em 30% das amostras (7/23), sempre

em heterozigose, e amplificado em 30% das amostras (7/23). Este gene encontra-se alterado em 2,03% dos casos de câncer, sendo o maior número de alterações encontradas em leucemia, síndromes mielodisplásicas, adenocarcinoma colorretal, mielofibrose e câncer de pulmão (não pequenas de células). A deleção deste gene é a sexta alteração mais frequente nestes tumores, seguida da amplificação (AACR PROJECT GENIE CONSORTIUM, 2017).

### 5.3.1 Associação entre CNV, presença de mutação no *RB1* e lateralidade

Amostras com mutação no *RB1* apresentaram 12 amplificações gênicas não observadas nas amostras sem mutação no *RB1*. Essas amplificações estavam relacionadas com vias de transdução de sinal, transcrição gênica, homeostase e biologia do desenvolvimento. Em contraste, as amostras sem mutação no *RB1* apresentaram 13 amplificações gênicas com maiores frequências que nas amostras com mutação no *RB1*. Estas amplificações estavam relacionadas a vias de transdução de sinal, sistema imune, transcrição gênica e vias relacionadas a doenças. Como citado anteriormente, as vias de transdução de sinal e transcrição gênica desempenham um importante papel no câncer e isso pode justificar o aumento da sua expressão em ambos os cenários.

Em relação às vias de transdução de sinal, nos dois grupos foi possível observar amplificação de componentes da sinalização através da via da família *MAPK* (*Mitogen Activated Protein Kinases*). A sinalização diferenciada desta via pode levar à proliferação descontrolada e resistência à apoptose em diversos tipos de câncer (SANTARPIA; LIPPMAN; EL-NAGGAR, 2012). Mutações no gene *BRAF* (*B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase*), conhecidas por levar a desregulação da sinalização por *MAPK* (CANTWELL-DORRIS; O'LEARY; SHEILS, 2011), foram observadas em duas amostras sem mutação no *RB1* analisadas neste estudo.

Apesar das vias de transcrição, de forma geral, ter apresentado amplificações nos dois grupos (com e sem mutação no *RB1*), partes diferentes dessas vias estavam afetadas em cada um deles. Nas amostras com mutação no *RB1* uma via específica ligada à transcrição estava exclusivamente amplificada, a de regulação da transcrição por *TP53* (*Tumor protein p53*). Esta via reprime a transcrição de genes alvos da família de fatores de transcrição E2F e, de forma indireta, envolve o *RB1*. A repressão é executada através da transativação de *CDKN1A* (*cyclin dependent*

*kinase inhibitor 1A*), gene que codifica a proteína p21, que por sua vez inibe CDK gerando hipofosfolição da pRB e reprimindo E2F (SULLIVAN *et al.*, 2018). A amplificação desta via pode não fazer parte do mecanismo tumoral e sim representar uma tentativa de compensação à falta do *RB1* funcional para reprimir E2F.

As vias com amplificação gênica mais frequente nas amostras com *RB1* mutado incluíam vias de sinalização envolvendo a via *PI3K* (*Phosphatidylinositol 3-kinase, putative*) / *AKT*. Muitos tumores estão associados à ativação anormal desta via e sua desregulação em retinoblastoma também é bem estabelecida, por vezes associada a mutações em alguns oncogenes componentes como *PTEN* (*Phosphatase and tensin homolog*), *PIK3CA* (*Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha*), *KRAS* (*KRAS proto-oncogene, GTPase*) e *AKT1* (*AKT serine/threonine kinase 1*) (COHEN *et al.*, 2008). No presente estudo, não foram encontradas mutações patogênicas no *PTEN*, porém 1/15 amostras (do paciente nº 80) apresentou mutação no gene *PIK3CA* (*Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha*) e 3/15 amostras (dos pacientes nº 21, nº 31 e nº 60) apresentaram uma mesma deleção (g.25368460TCC>T) de duas bases no *KRAS*. A família *AKT* apresenta três isoformas (*AKT1*, *AKT2* e *AKT3*); *AKT1* e *AKT2* desempenham papéis opostos no controle da proliferação celular, sendo somente *AKT1* responsável por estimular a proliferação (HERON-MILHAVET *et al.*, 2006). No presente estudo, não foram observadas mutações no *AKT1*, enquanto que um paciente (nº 21) apresentou mutação patogênica no *AKT2*. A expressão diferenciada de alguns genes da via *PI3K / AKT* no retinoblastoma sugerem estes componentes como potenciais alvos terapêuticos (CHAKRABORTY *et al.*, 2007).

Em respeito a deleções, somente dois genes apresentaram-se mais frequentemente deletados na presença de mutação no *RB1*: *CRFL2* e *IL7R* (*Interleukin 7 Receptor*). A deleção em *CRLF2* foi discutida anteriormente por ter sido este o gene com maior frequência de deleções neste estudo. O gene *IL7R*, conhecido por desempenhar uma importante função na recombinação VDJ durante o desenvolvimento de linfócitos, apresenta-se mutado em algumas neoplasias como melanoma, adenocarcinoma colorretal, câncer de mama e, principalmente em câncer de útero (AACR PROJECT GENIE CONSORTIUM, 2017). Apesar de terem sido encontradas deleções completas deste gene no presente estudo, esta não é uma alteração comum, não sendo descrita nem mesmo em outras neoplasias.

Outros tipos de alterações no *IL7R* em retinoblastoma também não foram relatadas na literatura.

Em relação a lateralidade, apenas *KRAS* apresentou diferença significativa na frequência de amplificação, sendo mais frequentemente amplificado em tumores de pacientes com apresentação bilateral. A amplificação de *KRAS* foi descrita em outros tipos de câncer como pulmão e gástrico, sendo para este último um marcador de pior prognóstico (TAKAHASHI *et al.*, 2004; DENG *et al.*, 2012). Apesar de ter sido comprovado que *RB1* e *KRAS* atuam em conjunto tanto no desenvolvimento embrionário quanto no tumoral, não foram relatadas na literatura associações entre amplificação de *KRAS* e retinoblastoma.

Quanto a deleções, apenas o gene *MET* apresentou diferenças significativas, estando mais frequentemente deletado em casos bilaterais. Não há relatos sobre a deleção do gene *MET* em retinoblastoma, mas a sua inativação por MiR-140-5p foi descrita por suprimir proliferação e induzir apoptose e parada do ciclo celular nas células de retinoblastoma (LIAO *et al.*, 2018). Apesar de existirem interações entre *KRAS*, *MET* e *RB1*, o motivo de *KRAS* e *MET* estarem alterados apenas em amostras bilaterais não pode ser elucidado em vista do baixo número de casos bilaterais incluídos neste estudo.

## 6. CONCLUSÃO

Este estudo mostrou a importância de incorporar novas tecnologias ao Programa de Aconselhamento Genético através da detecção por NGS de duas mutações patogênicas constitutivas não detectadas por sequenciamento de Sanger e seis novas mutações patogênicas no gene *RB1*. Além disso, a utilização do NGS permitiu a identificação de 116 mutações patogênicas com frequências alélicas inferiores a 20%, que estariam fora dos limites de detecção do sequenciamento de Sanger.

Este estudo mostra a importância de utilizar vários programas de predição de patogenicidade para analisar variantes de *RB1* de significado incerto para um melhor acompanhamento dos portadores das variantes consideradas como deletérias até que mais informações estejam disponíveis. Também mostrou a importância de utilizar painéis de genes com tecnologia de NGS para identificação de mutações não previamente descritas. Em relação a análise de CNV, as amplificações foram as mais frequentes. Identificar amplificações associadas ao RB é de grande

importância, pois amplificação é comum em tumores e tem sido útil na identificação de novos oncogenes, assim como no diagnóstico, prognóstico, resposta a terapias e desenvolvimento de resistência. Por outro lado, a caracterização de deleções associadas ao RB pode indicar novos supressores tumorais relacionados a tumorigênese e ajudar a entender a pequena parcela de casos que permanecem com etiologia desconhecida. Os achados deste estudo contribuirão ao Programa de Aconselhamento Genético em Câncer do INCA.

No Brasil, a enucleação ainda é uma realidade para crianças com retinoblastoma. Entender e caracterizar melhor a doença investigando novos genes pode trazer direcionamentos e apontar novos alvos potenciais para terapias que permitirão o estabelecimento de estratégias para reduzir a perda da visão e a mortalidade que, segundo declaração do Serviço de Referência de Tumores Oculares (Unifesp) em 2015, acometia 35% das crianças brasileiras com retinoblastoma.

## 7. REFERÊNCIAS

AACR PROJECT GENIE CONSORTIUM. AACR Project GENIE: Powering Precision Medicine through an International Consortium. **Cancer Discovery**, v. 7, n. 8, p. 818–831, 2017.

ABRAMSON, D. H. Retinoblastoma in the 20th Century: Past Success and Future Challenges The Weisenfeld Lecture. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 46, n. 8, p. 2684, 2005.

ABRAMSON, D. H.; ELLSWORTH, R. M.; ZIMMERMAN, L. E. Nonocular cancer in retinoblastoma survivors. **Transactions. Section on Ophthalmology. American Academy of Ophthalmology and Otolaryngology**, v. 81, n. 3, p. 454–457, 1976.

ALBERT, D. M. Historic Review of Retinoblastoma. **Ophthalmology**, v. 94, n. 6, p. 654–662, 1987.

ALBERTSON, D. G. Gene amplification in cancer. **Trends in Genetics**, v. 22, n. 8, p. 447–455, 2006.

ANDREU-PEREZ, P. *et al.* Protein Arginine Methyltransferase 5 Regulates ERK1/2 Signal Transduction Amplitude and Cell Fate Through CRAF. **Science Signaling**, v. 4, n. 190, p. 01–28, 2011.

ATANESYAN, L. *et al.* Optimal fixation conditions and DNA extraction methods for MLPA analysis on FFPE tissue-derived DNA. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 147, n. 1, p. 60–68, 2017.

BALLATORI, S. E.; HINDS, P. W. Osteosarcoma: prognosis plateau warrants

retinoblastoma pathway targeted therapy. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 1, n. 1, p. 16001, 2016.

BALMER, A.; ZOGRAFOS, L.; MUNIER, F. Diagnosis and current management of retinoblastoma. **Oncogene**, v. 25, n. 38, p. 5341–5349, 2006.

BARBOSA, R. H. *et al.* screening of *RB1* alterations in brazilian patients with retinoblastoma and relatives with retinoma : Phenotypic and Genotypic associations. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v.54, n.5, p.3184–3194, 2013.

BARTUMA, K. *et al.* A 10-year experience of outcome in chemotherapy-treated hereditary retinoblastoma. **Acta Ophthalmologica**, v. 92, n. 5, p. 404–411, 2014.

BENCKE, E. L.; CANEVESE, F. F. Retinoblastoma: avaliação diagnóstica e tratamento. **Acta Medica**, v. 39, n. 2, p.402–415 2018.

BESTETTI, I. *et al.* 13q mosaic deletion including *RB1* associated to mild phenotype and no cancer outcome-case report and review of the literature. **Molecular Cytogenetics**, v. 11, n. 1, p. 1–8, 2018.

BRAGGIO, E., *et al.* Identification of three novel *RB1* mutations in Brazilian patients with retinoblastoma by "exon by exon" PCR mediated SSCP analysis. **Journal of Clinical Pathology**, v.57, n.6, p.585-590.

BREMNER, R.; CHEN, D.; PACAL, M. The RB Protein Family in Retinal Development and Retinoblastoma: New Insights from New Mouse Models. **Developmental Neuroscience**, v. 26, n. 5–6, p. 417–434, 2004.

BREMNER, R.; SAGE, J. The origins of retinoblastoma. **Nature**, v. 514, n. 7522, p. 312–313, 2014.

BROADDUS, E.; TOPHAM, A.; SINGH, A. D. Incidence of retinoblastoma in the USA: 1975-2004. **British Journal of Ophthalmology**, v. 93, n. 1, p. 21–23, 2009.

BUCHKOVICH, K. *et al.* The retinoblastoma protein is phosphorylated during specific phases of the cell cycle. **Cell**, v. 58, n. 6, p. 1097–1105, 1989.

CANADIAN RETINOBLASTOMA SOCIETY. National Retinoblastoma Strategy Canadian Guidelines for Care. **Canadian Journal of Ophthalmology**, v. 44, n. 2, p. 9–47, 2009.

CANTWELL-DORRIS, E. R.; O'LEARY, J. J.; SHEILS, O. M. BRAFV600E: Implications for Carcinogenesis and Molecular Therapy. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 10, n. 3, p. 385–394, 2011.

CARDENAS, M. G. *et al.* The expanding role of the BCL6 oncoprotein as a cancer therapeutic target. **Clinical Cancer Research**, v. 23, n. 4, p. 885–893, 2017.

CASTÉRA, L. *et al.* Fine mapping of whole *RB1* gene deletions in retinoblastoma patients confirms *PCDH8* as a candidate gene for psychomotor delay. **European Journal of Human Genetics**, v. 21, n. 4, p. 460–464, 2013.

CERAMI, E. *et al.* The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. **Cancer Discovery**, v.2, n.5, p.401–404, 2012.

CAVENEY, W. K. *et al.* Genetic origin of mutations predisposing to retinoblastoma. **Science**, v. 228, n. 4698, p. 501–503, 1985.

CHAKRABORTY, S. *et al.* Identification of genes associated with tumorigenesis of retinoblastoma by microarray analysis. **Genomics**, v. 90, n. 3, p. 344–353, 2007.

CHANG, Y.-I. *et al.* DNMT3A haploinsufficiency cooperates with oncogenic Kras to promote an early-onset T-cell acute lymphoblastic leukemia. **American Journal of Translational Research**, v. 9, n. 3, p. 1326–1334, 2017.

CHEN, P.-L. *et al.* Phosphorylation of the retinoblastoma gene product is modulated during the cell cycle and cellular differentiation. **Cell**, v. 58, n. 6, p. 1193–1198, 1989.

CHEN, X. *et al.* A Novel Retinoblastoma Therapy from Genomic and Epigenetic Analyses performed data analysis and bioinformatics support HHS Public Access. **Nature**, v. 481, n. 7381, p. 329–334, 2012.

**Chromosome 13q deletion.** 2016. Disponível em: <<https://rarediseases.info.nih.gov/diseases/1738/chromosome-13q-deletion>>. Acesso em: 20 dez. 2018.

COHEN, Y. *et al.* Hypermethylation of CpG island loci of multiple tumor suppressor genes in retinoblastoma. **Experimental Eye Research**, v. 86, p. 201–206, 2008.

COMAS, I. *et al.* Out-of-Africa migration and Neolithic coexpansion of Mycobacterium tuberculosis with modern humans. **Nature Genetics**, v. 45, n. 10, p. 1176–1182, 2013.

CREYTENS, D. *et al.* Atypical spindle cell lipoma: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular study emphasizing its relationship to classical spindle cell lipoma. **Virchows Archiv: An International Journal of Pathology**, v. 465, n. 1, p. 97–108, 2014.

DE CAMARGO, B. *et al.* Cancer incidence among children and adolescents in Brazil:

First report of 14 population-based cancer registries. **International Journal of Cancer**, v. 126, n. 3, p. 715–720, 2010.

DECAPRIO, J. A. *et al.* The product of the retinoblastoma susceptibility gene has properties of a cell cycle regulatory element. **Cell**, v. 58, n. 6, p. 1085–95, 1989.

DENG, N. *et al.* A comprehensive survey of genomic alterations in gastric cancer reveals systematic patterns of molecular exclusivity and co-occurrence among distinct therapeutic targets. **Gastric Cancer**, v. 61, n. 5, p. 673–684, 2012.

DESMET, F-O *et al.*, Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. **Nucleic Acids Research**, v.37,n.9, p.1-14, 2009.

DHOMEN, N.; MARAIS, R. New insight into BRAF mutations in cancer. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 17, n. 1, p. 31–39, 2007.

DI FIORE, R. *et al.* *RB1* in cancer: Different mechanisms of *RB1* inactivation and alterations of pRb pathway in tumorigenesis. **Journal of Cellular Physiology**, v. 228, n. 8, p. 1676–1687, 2013.

DICOMMO, D.; GALLIE, B. L.; BREMNER, R. Retinoblastoma: the disease, gene and protein provide critical leads to understand cancer. **Seminars in Cancer Biology**, v. 10, n. 4, p. 255–269, 2000.

DIMARAS, H. *et al.* Loss of *RB1* induces non-proliferative retinoma: increasing genomic instability correlates with progression to retinoblastoma. **Human Molecular Genetics**, v. 17, n. 10, p. 1363–1372, 2008.

DIMARAS, H. *et al.* Retinoblastoma. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 1, [s.n] p. 1–22, 2015.

DOLLFUS, M.-A.; AUVERT, B. Le gliome de la rétine (retinoblastome) et les pseudogliomes: étude clinique, génétique et thérapeutique **Societe Francaise d'Ophthalmologie**, [s.n; s.p], 1953.

FABREGAT *et al.* The Reactome Pathway Knowledgebase. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n.1, p.649-655.

FENSTERSEIFER, G. S. *et al.* **Descolamento de retina**. Disponível em: <<http://docs.bvsalud.org/biblioref/2018/04/882606/descolamento-de-retina.pdf>>. Acesso em: 29 dez. 2018.

**FISIOLOGIA**. Disponível em <<https://docplayer.com.br/40671896-Fisiologia-vias-aferentes-sistema-nervoso.html>>. Acesso em Acesso em 20 nov. 2019.

FOKKEMA I.F. *et al.* LOVD v.2.0: the next generation in gene variant databases. **Human Mutation**, v.32, n.5, p.557-563, 2011.

FRIEND, S. H. *et al.* A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. **Nature**, v. 323, n. 6089, p. 643–646, 1986.

FROIMCHUK, E.; JANG, Y.; GE, K. Histone H3 lysine 4 methyltransferase *KMT2D*. **Gene**, v. 627, p. 337–342, 2017.

GENG, L. *et al.* Indolyl-quinuclidinols inhibit *ENOX* activity and endothelial cell morphogenesis while enhancing radiation-mediated control of tumor vasculature. **FASEB Journal**, v. 23, n. 9, p. 2986–2995, 2009.

GIACINTI, C.; GIORDANO, A. RB and cell cycle progression. **Oncogene**, v. 25, n. 38, p. 5220–5227, 2006.

GORDON, G. M. *et al.* Deregulated G1-S control and energy stress contribute to the synthetic-lethal interactions between inactivation of RB and *TSC1* or *TSC2*. **Journal of Cell Science**, v. 126, n. 9, p. 2004–2013, 2013.

GOUVÊA, H. De. L'Hérédité des gliomes de la retine. **Boletins da Sociedade de Medicina e Cirurgia do Rio de Janeiro**. [s.l: s.n.], 1886.

GUO, Y. *et al.* The effect of strand bias in Illumina short-read sequencing data. **BMC Genomics**, v.13, n.666, p. 1–11, 2012.

GUPTA, S.; TAKEBE, N.; LORUSSO, P. Targeting the Hedgehog pathway in cancer. **Therapeutic Advances in Medical Oncology**, v. 2, n. 4, p. 237–50, 2010.

HAJJARI, M. *et al.* The potential role of *PHF6* as an oncogene : a genotranscriptomic / proteomic meta-analysis. **Tumor Biology**, v. 37, n. 4, p.5317–5325, 2015.

HARBOUR, J. W. Overview of RB gene mutations in patients with retinoblastoma. Implications for clinical genetic screening. **Ophthalmology**, v. 105, n. 8, p. 1442–1447, 1998.

HARBOUR, J. W.; DEAN, D. C. The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. **Genes & Development**, v. 14, n. 19, p. 2393–2409, 2000.

HASSLER, M. *et al.* Crystal Structure of the Retinoblastoma Protein N Domain Provides Insight into Tumor Suppression, Ligand Interaction, and Holoprotein Architecture. **Molecular Cell**, v. 28, n. 3, p. 371–385, 2007.

HENLEY, S. A.; DICK, F. A. The retinoblastoma family of proteins and their regulatory functions in the mammalian cell division cycle. **Cell Division**, v. 7, n. 1, p. 10, 2012.

HERON-MILHAVET, L. *et al.* Only Akt1 Is Required for Proliferation, while Akt2 Promotes Cell Cycle Exit through p21 Binding. **Molecular and Cellular Biology**, v. 26, n. 22, p. 8267–8280, 2006.

HUYNH, K. D. *et al.* *BCOR*, a novel corepressor involved in BCL-6 repression Genes Dev.-2000-Huynh-1810-23.pdf. **Genes & Development**, v. 14, n. 14, p. 1810–1823, 2000.

IVO, D. *et al.* Menin controls the concentration of retinoblastoma protein. **Cell Cycle**, v. 10, n. 1, p. 166–168, 2011.

JAKOBIEC, F. A. *et al.* Retinoblastoma and intracranial malignancy. **Cancer**, v. 39, n. 5, p. 2048–2058, 1977.

JONES, K. L. **Padrões reconhecíveis de malformações congênitas**. 6ed. Elsevier, 1998.

JÚNIOR, M. E. M. *et al.* Leucocoria na infância: diagnóstico diferencial por ultrasonografia, tomografia computadorizada e ressonância magnética. **Radiologia Brasileira**, v. 37, n. 2, p. 129–138, 2004.

KAISER, P. *et al.* Retinoblastoma. **Digital Journal of Ophthalmology**. 2003. Disponível em <<http://www.djo.harvard.edu/site.php?url=/patients/pi/436>>. Acesso em 30 set. 2018.

KANOE, H. *et al.* Amplification of the *CDK4* gene in sarcomas: tumor specificity and relationship with the RB gene mutation. **Anticancer Research**, v. 18, n. 4A, p. 2317–2321, 1988.

KANTIDAKIS, T. *et al.* Mutation of cancer driver MLL2 results in transcription stress

and genome instability. **Genes & Development**, v. 30, n. 4, p. 408–420, 2016.

KIVELÄ, T.; POLKUNEN, M.-L. Pieter Pauw's Tumor Oculorum. **Archives of Ophthalmology**, v. 121, n. 6, p. 881, 2003.

KNUDSEN, E. S.; WITKIEWICZ, A. K. The Strange Case of CDK4/6 Inhibitors: Mechanisms, Resistance, and Combination Strategies. **Trends in Cancer**, v. 3, n. 1, p. 39–55, 2017.

KNUDSON, A. G. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 68, n. 4, p. 820–823, 1971.

KONG, E.; HINDS, W., P. The Retinoblastoma protein in osteosarcomagenesis. **Osteosarcoma**, 3ed. IntechOpen, 2012.

KOOI, I. E. *et al.* Somatic genomic alterations in retinoblastoma beyond *RB1* are rare and limited to copy number changes. **Scientific Reports**, v. 6, [s. n.], p. 25264, 2016.

KRISHNA, S. M.; YU, G.-P.; FINGER, P. T. The effect of race on the incidence of retinoblastoma. **Journal of Pediatric Ophthalmology and Strabismus**, v. 46, n. 5, p. 288–293, 2009.

LATIL, A. *et al.* CHC1-L, a candidate gene for prostate carcinogenesis at 13q14.2, is frequently affected by loss of heterozygosity and underexpressed in human prostate cancer. **International Journal of Cancer**, v. 99, n. 5, p. 689–696, 2002.

LEE, S. *et al.* Forerunner genes contiguous to *RB1* contribute to the development of in situ neoplasia. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the**

**United States of America**, v. 104, n. 34, p.13732–13737, 2007.

LELE, K. P.; PENROSE, L. S.; STALLARD, H. B. Chromosome deletion in a case of retinoblastoma. **Annals of Human Genetics**, v. 27, p. 171–174, 1963.

LERCHE, V. Merkwürdige Entartung des linken Augapfels bei alien (3) männlichen kindern einer Familie. **Vermischte Abhandlungen aus dem**. [s.v., s.n], 188–196, 1821.

LIAO, Y. *et al.* MiR-140-5p suppresses retinoblastoma cell growth via inhibiting c-Met/AKT/mTOR pathway. **Bioscience Reports**, v. 38, n. 6, 2018.

LIU, Y. *et al.* Cloning of two candidate tumor suppressor genes within a 10 kb region on chromosome 13q14, frequently deleted in chronic lymphocytic leukemia. **Oncogene**, v. 15, n. 20, p. 2463–2473, 1997.

LOHMANN, D. R. *et al.* The Spectrum of *RB1* Germ-Line Mutations in Hereditary Retinoblastoma. **The American Journal of Human Genetics**, v. 58, p. 940–949, 1996.

LOHMANN, D. R. *RB1* gene mutations in retinoblastoma. **Human Mutation**, v.14, n.4, p.283-288, 1999.

LUO, R. X.; POSTIGO, A. A.; DEAN, D. C. Rb Interacts with Histone Deacetylase to Repress Transcription. **Cell**, v. 92, n. 4, p. 463–473, 1998.

MARK F, B.; BARRY W, C.; MICHAEL A, P. **Neurociências: Desvendando o Sistema Nervoso**. 4. ed. Artmed, 2017.

**MEDCALC: easy-to-use statistical software**, 2019. Disponível em: <<https://www.medcalc.org/>>. Acesso em: 24 mar. 2019.

MILLER, S. A.; DYKES, D. D.; POLESKY, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Research**, v. 16, n. 3, p. 1215, 1988.

MITTER, D. *et al.* Genotype–phenotype correlations in patients with retinoblastoma and interstitial 13q deletions. **European Journal of Human Genetics**, v. 19, n. 9, p. 947–958, 2011.

MONTAGUT, C.; SETTLEMAN, J. Targeting the RAF–MEK–ERK pathway in cancer therapy. **Cancer Letters**, v. 283, n. 2, p. 125–134, 2009.

MONTEIRO, A. N. A.; WAIZBORT, R. The accidental cancer geneticist: Hilário de gouvêa and hereditary retinoblastoma. **Cancer Biology and Therapy**, v. 6, n. 5, p. 811–813, 2007.

MORENO, F. *et al.* A population-based study of retinoblastoma incidence and survival in Argentine children. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 61, n. 9, p. 1610–1615, 2014.

MOSCHOS, M. M. From Fungus haematodes to Retinoblastoma. **Journal of the Balkan Union of Oncology**, v. 22, n. 6, p. 1599–1602, 2017.

MURPHREE, A. L.; TRICHE, T. J. An epigenomic mechanism in retinoblastoma : the end of the story ? **Genome Medicine**, v.2, n.15 p. 2–4, 2012.

NAGL, N. G. *et al.* The p270 (ARID1A/SMARCF1) Subunit of Mammalian SWI/SNF-Related Complexes Is Essential for Normal Cell Cycle Arrest. **Cancer Research**, v.

65, n. 20, p. 9236–9244, 2005.

**OMIM, Online Mendelian Inheritance in Man.** Número MIM: 180200, 2018. Disponível em: <<https://omim.org/>> . Acesso em: 28 out. 2018.

**One Retinoblastoma World.** 2015. Disponível em: <<http://1rbw.org/>>. Acesso em: 25 set. 2018.

PAPPAS, L. *et al.* Genomic instability and proliferation/survival pathways in *RB1*-deficient malignancies. **Advances in Biological Regulation**, v. 64, p. 20–32, 2017.

PARSONS, J.; RIDLEY, C. OWEN, S.A. Glioma retinae. **Roy London Ophthalmic Hospital Report**, v.16, [s. n.], p.323–369. 1906.

PELLEGRINI, C. *et al.* Understanding the Molecular Genetics of Basal Cell Carcinoma. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 11, 2017.

PELTONEN, S.; KALLIONPÄÄ, R. A.; PELTONEN, J. Neurofibromatosis type 1 (*NF1*) gene: Beyond café au lait spots and dermal neurofibromas. **Experimental Dermatology**, v. 7, [s. n.] , p. 645–648, 2017.

RIBEIRO BRITO, P.; VEITZMAN, S. Causas de cegueira e baixa visão em crianças. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 63, n. 1, p. 49–54, 2000.

RICHARDS, 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. **Genetics in Medicine**, v. 17, n.5, p.405–424, 2015.

ROHLIN, A. *et al.* Parallel sequencing used in detection of mosaic mutations: Comparison with four diagnostic DNA screening techniques. **Human Mutation**, v. 30, n. 6, p. 1012–1020, 2009.

ROSS-ADAMS, H. *et al.* Integration of copy number and transcriptomics provides risk stratification in prostate cancer: A discovery and validation cohort study. **EBioMedicine**, v. 2, n. 9, p. 1133–1144, 2015.

RUSHLOW, D. *et al.* Detection of mosaic *RB1* mutations in families with retinoblastoma. **Human Mutation**, v. 30, n. 5, p. 842–851, 2009.

RUSHLOW, D. E. *et al.* Characterisation of retinoblastomas without *RB1* mutations: Genomic, gene expression, and clinical studies. **The Lancet Oncology**, v. 14, n. 4, p. 327–334, 2013.

SAGE, J. *et al.* Targeted disruption of the three Rb-related genes leads to loss of G 1 control and immortalization. **Genes & Development**, v.14, n.23, p. 3037–3050, 2000.

SALOMÃO, S. R.; MITSUHIRO, M. R. K. H.; BELFORT, R. Visual impairment and blindness: An overview of prevalence and causes in Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 81, n. 3, p. 539–549, 2009.

SANTARPIA, L.; LIPPMAN, S. M.; EL-NAGGAR, A. K. Targeting the MAPK–RAS–RAF signaling pathway in cancer therapy. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 16, n. 1, p. 103–119, 2012.

SAVATIER, P. Withdrawal of differentiation inhibitory activity / leukemia inhibitory factor up-regulates D-type cyclins and cyclin-dependent kinase inhibitors in mouse embryonic stem cells. **Oncogene**, v.12 n.2, p.309-322, 1996.

SCHMITT, M. W.; LOEB, L. A.; SALK, J. J. The influence of subclonal resistance mutations on targeted cancer therapy. **Nature Reviews. Clinical Oncology**, v. 13, n. 6, p. 335–347, 2016.

SCHOUTEN, J. P. *et al.* Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 12, 2002.

SCHWERMER, M. *et al.* Comprehensive characterization of *RB1* mutant and *MYCN* amplified retinoblastoma cell lines. **Experimental Cell Research**, v. 375, n. 2, p. 92–99, 2019.

SELISTRE, S. G. A. *et al.* Retinoblastoma in a pediatric oncology reference center in Southern Brazil. **BMC Pediatrics**, v. 16, n. 48, p.1–9, 2016.

SENF, S. H. *et al.* RETINOBLASTOMA: A REVIEW. **Saudi Bulletin of Ophthalmology**, v. 3, n. 4, p. 193–200, 1988.

SEVER, R.; BRUGGE, J. S. Signal Transduction in Cancer. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 5, 2015.

SHERRY S.T. *et al.* dbSNP: the NCBI database of genetic variation. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n.1, p.308-311, 2001.

SINGH, S. K. *et al.* A rare case of adult onset retinoblastoma. **Oman Journal of Ophthalmology**, v. 4, n. 1, p. 25–27, 2011.

SIPPEL, K. C. *et al.* Frequency of Somatic and Germ-Line Mosaicism in Retinoblastoma: Implications for Genetic Counseling. **The American Journal of Human Genetics**, v. 62, n. 3, p. 610–619, 1998.

SOLIMAN, S. E. *et al.* Genetics and Molecular Diagnostics in Retinoblastoma—An Update. **Asia-Pacific Journal of Ophthalmology**, v. 6, n. 2, p. 197–207, 2017.

SULLIVAN *et al.* Mechanisms of transcriptional regulation by p53. **Cell Death and Differentiation**, v.25, [s. n.], p.133–143, 2018.

TAKAHASHI, C. *et al.* Genetic interaction between Rb and K-ras in the control of differentiation and tumor suppression. **Molecular and Cellular Biology**, v. 24, n. 23, p. 10406–10415, 2004.

TATE *et al.* COSMIC: the Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer. **Nucleic Acids Research**, v.47, n.D1, p.941-947, 2018.

TANG, Z. *et al.* CREB-binding protein regulates lung cancer growth by targeting MAPK and CPSF4 signaling pathway. **Molecular Oncology**, v. 10, n. 2, p. 317–329, 2016.

TAYLOR, M. D. *et al.* Mutations in SUFU predispose to medulloblastoma. **Nature Genetics**, v. 31, n. 3, p. 306–310, 2002.

TOGUCHIDA, J. *et al.* Complete Genomic Sequence of the Human Retinoblastoma Susceptibility Gene. **Genomics**, v. 17, n. 3, p. 535–543, 1993.

TRUONG, B. *et al.* Ethnic, Racial, and Socioeconomic Disparities in Retinoblastoma. **JAMA Pediatrics**, v. 169, n. 12, p. 1096, 2015.

UCSC TABLE BROWSER. The UCSC Table Browser data retrieval tool. **Nucleic Acids Research**, v.3, [s.n], p.493-496, 2004.

VÉLEZ-CRUZ, R.; JOHNSON, D. G. The retinoblastoma (RB) tumor suppressor: Pushing back against genome instability on multiple fronts. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 8, 2017.

VILLICAÑA, C.; CRUZ, G.; ZURITA, M. The basal transcription machinery as a target for cancer therapy. **Cancer Cell International**, v.14, n. 18, p.1-15, 2014.

WARDROP, J. Observations on Fungus Hæmatodes or Soft Cancer in Several of the Most Important Organs of the Human Body. **Forgotten Books**, 2017.

WEINBERG, R. a. The retinoblastoma protein and cell cycle control. **Cell**, v. 81, n. 3, p. 323–330, 1995.

WELLENSTEIN, M. D.; VISSER, K. E. De. Review Cancer-Cell-Intrinsic Mechanisms Shaping the Tumor Immune Landscape. **Immunity**, v. 48, n. 3, p. 399–416, 2018.

XU, X. L. *et al.* Rb suppresses human cone-precursor-derived retinoblastoma tumours. **Nature**, v. 514, n. 7522, p. 385–388, 2014.

YOUNG, B. *et al.* **Histologia Funcional: Texto e Atlas em Cores**. 12. ed. Guanabara Koogan, 2010.

YU *et al.* Phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway plays an important role in chemoresistance of gastric cancer cells against etoposide and doxorubicin induced cell death. **International Journal of Cancer**, v. 122, n.2, p.433-443, 2008.

YUN, J. *et al.* Epidemiology and *RB1* gene of retinoblastoma. **International Journal of Ophthalmology**, v. 4, n. 1, p. 103–109, 2011.

ZACK, T. I. *et al.* Pan-cancer patterns of somatic copy number alteration. **Nature Genetics**, v. 45, n. 10, p. 1134–1140, 2013.

ZHANG, H. S.; POSTIGO, A. A.; DEAN, D. C. Active Transcriptional Repression by the Rb–E2F Complex Mediates G1 Arrest Triggered by p16INK4a, TGF $\beta$ , and Contact Inhibition. **Cell**, v. 97, n. 1, p. 53–61, 1999.

ZHANG, D. *et al.* Frequent silencing of protocadherin 8 by promoter methylation, a candidate tumor suppressor for human gastric cancer. **Oncology Reports**, v. 28, n.5, p.1785-1791, 2012.

ZHONG, M. *et al.* Retina, Retinol, Retinal and the Natural History of Vitamin A as a Light Sensor. **Nutrients**, v.4, p. 2069-2096, 2012.

ZHU, X. *et al.* Mechanisms of loss of heterozygosity in retinoblastoma. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 59, p. 249–252, 1992.

## 8. ANEXOS

### ANEXO I

Aprovação do Projeto “Estudos Citomoleculares em Retinoblastoma” pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer.



Rio de Janeiro, 13 de agosto de 2001.

Dr. Héctor N. Seuànez Abreu  
Coordenador do Estudo

**Referência ao** Protocolo 40/00: “Estudos Citomoleculares em Retinoblastoma”.

Prezado Doutor

O COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA do Instituto Nacional de Câncer, reunido no dia 30 de julho de 2001, **aprovou** o estudo intitulado: Protocolo 40/00 - “Estudos Citomoleculares em Retinoblastoma”, bem como seu Consentimento Livre e Esclarecido.

Estamos encaminhando a documentação pertinente ao CONEP, com vistas a registro e arquivamento.

De acordo com o fluxograma de aprovação de estudos clínicos vigente, o protocolo lhe está sendo devolvido para que seja encaminhado, por V.S<sup>a</sup>, a Fundação Ary Frauzino para providências quanto ao Contrato de Patrocínio.

Atenciosamente

  
Dr. Luis Otávio Olivatto  
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa  
CEP-INCA

## ANEXO II

Tabela de mutações patogênicas e informações adicionais dos pacientes. Lat= lateralidade, ID= idade no diagnóstico, HF= histórico familiar de retinoblastoma, Chr= cromossomo.

Paciente	Sexo	Lat	Sintoma	ID	HF	Tipo de amostra	Chr	Referência	Variante	Gene	Profundidade de cobertura (vezes)	Profundidade de cobertura de cada alelo	Frequência alélica	Frequência alélica da variante (%)
3	fem	uni	leucocoria	25	não	tumor	X	NM_001123385.1	c.4173_4428+1391insAA	<i>BCOR</i>	172	C=85 CTT=87	C=0.494 CTT=0.506	0,506
							X	NM_001123385.1	c.4207_4227insATTCAGA AAGCGCCGGAGC	<i>BCOR</i>	1837	G=864 GCTCCGGCCGC TTTCTGAAT=51	G=0.47 GCTCCGGCCGCTTTC TGAAT=0.028	0,028
6	masc	uni	leucocoria	35	não	tumor	1	NM_024408.3	c.2491C>T	<i>NOTCH2</i>	1229	G=1176 A=53	G=0.957 A=0.043	0,043
							1	NM_004958.3	c.4899G>A	<i>MTOR</i>	124	C=96 T=28	C=0.774 T=0.226	0,226
							1	NM_001128425.1	c.1309-1G>A	<i>MUTYH</i>	265	C=250 T=15	C=0.943 T=0.057	0,057
							1	NM_024408.3	c.5002+1G>A	<i>NOTCH2</i>	1811	C=1739 T=72	C=0.96 T=0.04	0,04
							5	NM_001127510.2	c.1594C>T	<i>APC</i>	378	C=361 T=17	C=0.955 T=0.045	0,045
							5	NM_001127510.2	c.1205_1209delGAGT	<i>APC</i>	76	GGAGT=13 G=10	GGAGT=0.171 G=0.132	0,132
							7	NM_032415.4	c.1522C>T	<i>CARD11</i>	2441	G=2289 A=152	G=0.938 A=0.062	0,062
							7	NM_032415.4	c.864+1G>A	<i>CARD11</i>	429	C=401 T=28	C=0.935 T=0.065	0,065
							9	NM_004972.3	c.3334C>T	<i>JAK2</i>	204	C=186 T=18	C=0.912 T=0.088	0,088
							9	NM_017617.3	c.6180+1G>A	<i>NOTCH1</i>	2490	C=2380 T=110	C=0.956 T=0.044	0,044
							12	NM_000545.5	c.1819C>T	<i>HNFB1A</i>	119	C=109 T=10	C=0.916 T=0.084	0,084
							12	NM_001982.3	c.3199C>T	<i>ERBB3</i>	1194	C=1126 T=68	C=0.943 T=0.057	0,057
							12	NM_001982.3	c.3403C>T	<i>ERBB3</i>	512	C=487 T=25	C=0.951 T=0.049	0,049
							12	NM_003482.3	c.10232-1G>A	<i>MLL2</i>	1078	C=1035 T=43	C=0.96 T=0.04	0,04
							16	NM_000135.2	c.2638C>T	<i>FANCA</i>	1874	G=1801 A=73	G=0.961 A=0.039	0,039
16	NM_000833.3	c.331C>T	<i>GRIN2A</i>	1788	G=1726 A=62	G=0.965 A=0.035	0,035							
17	NM_001042492.2	c.7107G>A	<i>NF1</i>	1039	G=982 A=57	G=0.945 A=0.055	0,055							
19	NM_001128849.1	c.1926G>A	<i>SMARCA4</i>	285	G=271 A=14	G=0.951 A=0.049	0,049							

Paciente	Sexo	Lat	Sintoma	ID	HF	Tipo de amostra	Chr	Referência	Variante	Gene	Profundidade de cobertura (vezes)	Profundidade de cobertura de cada alelo	Frequência alélica	Frequência alélica da variante (%)
							20	NM_080425.2	c.1773G>A	GNAS	1363	G=1313 A=50	G=0.963 A=0.037	0,037
							20	NM_198291.1	c.554-1G>A	SRC	961	G=910 A=51	G=0.947 A=0.053	0,053
							22	NM_001429.3	c.2803C>T	EP300	1231	C=1168 T=63	C=0.949 T=0.051	0,051
							22	NM_001429.3	c.4397G>A	EP300	416	G=394 A=22	G=0.947 A=0.053	0,053
							22	NM_001429.3	c.5601_5603insAT	EP300	55	C=43 CAT=12	C=0.782 CAT=0.218	0,218
							X	NM_000489.3	c.748C>T	ATRX	1852	G=1788 A=64	G=0.965 A=0.035	0,035
							X	NM_000061.2	c.309+1G>C	BTK	310	C=298 G=12	C=0.961 G=0.039	0,039
21	masc	uni	leucocoria	32	não	tumor	1	NM_006015.4	c.2427C>A	ARID1A	156	C=140 A=16	C=0.897 A=0.103	0,103
							2	NM_005235.2	c.1198+1G>A	ERBB4	180	C=165 T=15	C=0.917 T=0.083	0,083
							3	NM_001172567.1	c.914G>A	MYD88	710	G=672 A=38	G=0.946 A=0.054	0,054
							5	NM_005211.3	c.*2033C>T	CSF1R	1679	C=1627 T=52	C=0.969 T=0.031	0,031
							7	NM_001127500.1	c.2271G>A	MET	1582	G=1535 A=47	G=0.97 A=0.03	0,03
							9	NM_017617.3	c.861G>A	NOTCH1	4881	C=4716 T=165	C=0.966 T=0.034	0,034
							12	NM_003482.3	c.7162C>T	MLL2	1241	G=1201 A=40	G=0.968 A=0.032	0,032
							12	NM_001982.3	c.874+1G>A	ERBB3	146	G=137 A=9	G=0.938 A=0.062	0,062
							12	NM_033360.2	c.485_487delinsA	KRAS	275	TCC=0 T=160	TCC=0.0 T=0.582	0,582
							12	NM_002834.3	c.853+1G>A	PTPN11	3188	G=3085 A=103	G=0.968 A=0.032	0,032
							16	NM_000833.3	c.4123C>T	GRIN2A	428	G=408 A=20	G=0.953 A=0.047	0,047
							17	NM_001042492.2	c.1105C>T	NF1	637	C=596 T=41	C=0.936 T=0.064	0,064
							19	NM_001626.4	c.1285C>T	AKT2	738	G=705 A=33	G=0.955 A=0.045	0,045
							19	NM_000215.3	c.2419C>T	JAK3	3368	G=3245 A=123	G=0.963 A=0.037	0,037
							22	NM_000268.3	c.1762C>T	NF2	1197	C=1160 T=37	C=0.969 T=0.031	0,031
							X	NM_000044.3	c.10C>T	AR	204	C=190 T=14	C=0.931 T=0.069	0,069
							X	NM_001164617.1	c.1337G>A	GPC3	233	C=217 T=16	C=0.931 T=0.069	0,069

Paciente	Sexo	Lat	Sintoma	ID	HF	Tipo de amostra	Chr	Referência	Variante	Gene	Profundidade de cobertura (vezes)	Profundidade de cobertura de cada alelo	Frequência alélica	Frequência alélica da variante (%)
							X	NM_001123385.1	c.41G>A	BCOR	178	C=167 T=11	C=0.938 T=0.062	0,062
							X	NM_000489.3	c.4902G>A	ATRX	507	C=484 T=23	C=0.955 T=0.045	0,045
							X	NM_000061.2	c.843G>A	BTK	315	C=299 T=16	C=0.949 T=0.051	0,051
							X	NM_021140.2	c.991C>T	KDM6A	1840	C=1767 T=73	C=0.96 T=0.04	0,04
31	masc	bi	leucocoria	17	sim (avô paterno com retinoma)	tumor	12	NM_033360.2	c.484_485delGG	KRAS	251	TCC=0 T=93	TCC=0.0 T=0.371	0,371
37	masc	uni	estrabismo	10	não	tumor	X	NM_001123385.1	c.3655G>T	BCOR	131	C=119 A=10	C=0.908 A=0.076	0,076
							X	NM_001123385.1	c.4126G>T	BCOR	49	C=30 A=19	C=0.612 A=0.388	0,388
55	masc	uni	hiperemia	55	não	tumor	7	NM_004333.4	c.980+1G>A	BRAF	1334	C=1293 T=41	C=0.969 T=0.031	0,031
58	fem	uni	leucocoria	9	sim (irmã com retinoma)	sangue	2	NM_005235.2	c.3013C>T	ERBB4	126	G=110 A=16	G=0.873 A=0.127	0,127
						tumor	17	NM_007300.3	c.788-401T>C	BRCA1	128	A=118 G=10	A=0.922 G=0.078	0,078
60	masc	uni	leucocoria	10	não	tumor	5	NM_001127510.2	c.1779G>A	APC	126	G=114 A=12	G=0.905 A=0.095	0,095
							12	NM_033360.2	c.485_487insGG	KRAS	225	TCC=0 T=149	TCC=0.0 T=0.662	0,662
							22	NM_001429.3	c.3590+1G>A	EP300	578	G=558 A=20	G=0.965 A=0.035	0,035
62	masc	uni	estrabismo	22	não	sangue	1	NM_006182.2	c.1099+1G>A	DDR2	276	G=261 A=15	G=0.946 A=0.054	0,054
						tumor	1	NM_006015.4	c.3218G>A	ARID1A	674	G=634 A=40	G=0.941 A=0.059	0,059
							1	NM_004958.3	c.451C>T	MTOR	2198	G=2122 A=76	G=0.965 A=0.035	0,035
							1	NM_004958.3	c.4898G>A	MTOR	142	C=120 T=22	C=0.845 T=0.155	0,155
							1	NM_004958.3	c.4899G>A	MTOR	109	C=79 T=30	C=0.725 T=0.275	0,275
							1	NM_001128425.1	c.-42+1G>A	MUTYH	1405	C=1351 T=54	C=0.962 T=0.038	0,038
							1	NM_006015.4	c.3539+1G>A	ARID1A	2905	G=2776 A=129	G=0.956 A=0.044	0,044
							2	NM_001190274.1	c.1138C>T	FBXO11	386	G=370 A=16	G=0.959 A=0.041	0,041
							2	NM_006164.4	c.421C>T	NFE2L2	3094	G=2985 A=109	G=0.965 A=0.035	0,035

Paciente	Sexo	Lat	Sintoma	ID	HF	Tipo de amostra	Chr	Referência	Variante	Gene	Profundidade de cobertura (vezes)	Profundidade de cobertura de cada alelo	Frequência alélica	Frequência alélica da variante (%)
							2	NM_004304.4	c.4164+1G>A	ALK	968	C=917 T=51	C=0.947 T=0.053	0,053
							3	NM_004656.2	c.1447C>T	BAP1	1819	G=1736 A=83	G=0.954 A=0.046	0,046
							3	NM_004628.4	c.2475G>A	XPC	2726	C=2633 T=93	C=0.966 T=0.034	0,034
							3	NM_033084.3	c.2776C>T	FANCD2	867	C=834 T=33	C=0.962 T=0.038	0,038
							3	NM_001098210.1	c.2076+1G>A	CTNNB1	1433	G=1368 A=65	G=0.955 A=0.045	0,045
							4	NM_002253.2	c.67+1G>A	KDR	394	C=356 T=38	C=0.904 T=0.096	0,096
							5	NM_181523.2	c.1005G>A	PIK3R1	274	G=260 A=14	G=0.949 A=0.051	0,051
							5	NM_005211.3	c.1350G>A	CSF1R	1082	C=1046 T=36	C=0.967 T=0.033	0,033
							5	NM_005211.3	c.477G>A	CSF1R	804	C=761 T=43	C=0.947 T=0.053	0,053
							7	NM_004333.4	c.1525C>T	BRAF	991	G=951 A=40	G=0.96 A=0.04	0,04
							7	NM_032415.4	c.2214G>A	CARD11	552	C=530 T=22	C=0.96 T=0.04	0,04
							7	NM_005228.3	c.2694G>A	EGFR	481	G=437 A=44	G=0.909 A=0.091	0,091
							7	NM_032415.4	c.8-1G>A	CARD11	398	C=379 T=19	C=0.952 T=0.048	0,048
							9	NM_007313.2	c.3283C>T	ABL1	179	C=165 T=14	C=0.922 T=0.078	0,078
							11	NM_024426.4	c.994+1G>A	WT1	754	C=710 T=44	C=0.942 T=0.058	0,058
							12	NM_003482.3	c.11044C>T	MLL2	936	G=889 A=47	G=0.95 A=0.05	0,05
							12	NM_003482.3	c.8159G>A	MLL2	157	C=145 T=12	C=0.924 T=0.076	0,076
							12	NM_003482.3	c.4963+1G>A	MLL2	2504	C=2408 T=96	C=0.962 T=0.038	0,038
							12	NM_000075.3	c.*1891C>T	CDK4	2713	C=2602 T=111	C=0.959 T=0.041	0,041
							14	NM_000369.2	c.22C>T	TSHR	259	C=240 T=19	C=0.927 T=0.073	0,073
							16	NM_004380.2	c.5848C>T	CREBBP	71	G=57 A=14	G=0.803 A=0.197	0,197
							16	NM_004360.3	c.67C>T	CDH1	373	C=350 T=23	C=0.938 T=0.062	0,062
							16	NM_000548.3	c.*2996C>T	TSC2	280	G=265 A=15	G=0.946 A=0.054	0,054
							16	NM_000135.2	c.2222+1G>A	FANCA	1491	C=1438 T=53	C=0.964 T=0.036	0,036
							16	NM_004380.2	c.5058+1G>A	CREBBP	715	C=683 T=32	C=0.955 T=0.045	0,045
							17	NM_001042492.2	c.7395-1G>A	NF1	820	G=784 A=36	G=0.956 A=0.044	0,044

Paciente	Sexo	Lat	Sintoma	ID	HF	Tipo de amostra	Chr	Referência	Variante	Gene	Profundidade de cobertura (vezes)	Profundidade de cobertura de cada alelo	Frequência alélica	Frequência alélica da variante (%)
							22	NM_003073.3	c.1046G>A	SMARCB1	2344	G=2271 A=73	G=0.969 A=0.031	0,031
							22	NM_001005735.1	c.1201C>T	CHEK2	792	G=746 A=46	G=0.942 A=0.058	0,058
							22	NM_001429.3	c.5692C>T	EP300	1613	C=1556 T=57	C=0.965 T=0.035	0,035
							22	NM_001005735.1	c.1504+1G>A	CHEK2	5426	C=5217 T=209	C=0.961 T=0.039	0,039
							22	NM_001429.3	c.729+1G>A	EP300	439	G=411 A=28	G=0.936 A=0.064	0,064
							X	NM_005120.2	c.558G>A	MED12	324	G=305 A=19	G=0.941 A=0.059	0,059
							X	NM_005120.2	c.967C>T	MED12	684	C=654 T=30	C=0.956 T=0.044	0,044
64	masc	bi	leucocoria	15	não	tumor	1	NM_024408.3	c.6028-1G>A	NOTCH2	183	C=172 T=11	C=0.94 T=0.06	0,06
							3	NM_001098210.1	c.1148G>A	CTNNB1	759	G=726 A=33	G=0.957 A=0.043	0,043
							3	NM_014159.6	c.4917+1G>A	SETD2	406	C=389 T=17	C=0.958 T=0.042	0,042
							5	NM_181523.2	c.1600C>T	PIK3R1	383	C=365 T=18	C=0.953 T=0.047	0,047
							9	NM_000368.4	c.2813+1G>A	TSC1	561	C=541 T=20	C=0.964 T=0.036	0,036
							15	NM_002755.3	c.328C>T	MAP2K1	288	C=274 T=14	C=0.951 T=0.049	0,049
							X	NM_000489.3	c.4902G>A	ATRX	141	C=127 T=14	C=0.901 T=0.099	0,099
66	fem	uni	estrabismo	7	não	tumor	1	NM_024408.3	c.5273G>A	NOTCH2	452	C=436 T=16	C=0.965 T=0.035	0,035
							3	NM_014159.6	c.5380C>T	SETD2	302	G=290 A=12	G=0.96 A=0.04	0,04
							4	NM_002253.2	c.2839C>T	KDR	252	G=240 A=12	G=0.952 A=0.048	0,048
							12	NM_001982.3	c.548-1G>A	ERBB3	275	G=263 A=12	G=0.956 A=0.044	0,044
							16	NM_004380.2	c.979C>T	CREBBP	279	G=265 A=14	G=0.95 A=0.05	0,05
							22	NM_000268.3	c.1762C>T	NF2	303	C=282 T=18	C=0.931 T=0.059	0,059

Paciente	Sexo	Lat	Sintoma	ID	HF	Tipo de amostra	Chr	Referência	Variante	Gene	Profundidade de cobertura (vezes)	Profundidade de cobertura de cada alelo	Frequência alélica	Frequência alélica da variante (%)
75	fem	uni	leucocoria	25	não	tumor	1	NM_004958.3	c.6114_6124insGGTTACA	<i>MTOR</i>	67	T=58 TTGTAACC=4	T=0.866 TTGTAACC=0.06	0,06
							20	NM_080425.2	c.2631G>A	<i>GNAS</i>	66	G=60 A=6	G=0.909 A=0.091	0,091
							X	NM_001123385.1	c.3481A>T	<i>BCOR</i>	935	T=539 A=395	T=0.576 A=0.422	0,422
80	masc	uni	leucocoria	27	não	tumor	3	NM_006218.2	c.1911+1G>A	<i>PIK3CA</i>	281	G=269 A=12	G=0.957 A=0.043	0,043
							X	NM_021140.2	c.860G>A	<i>KDM6A</i>	124	G=114 A=10	G=0.919 A=0.081	0,081
86	masc	uni	estrabismo	5	não	tumor	1	NM_003000.2	c.603G>A	<i>SDHB</i>	380	C=363 T=17	C=0.955 T=0.045	0,045
							12	NM_003482.3	c.7162C>T	<i>MLL2</i>	320	G=298 A=22	G=0.931 A=0.069	0,069
							14	NM_001271282.1	c.573+1G>A	<i>DICER1</i>	1029	C=994 T=35	C=0.966 T=0.034	0,034
							17	NM_007300.3	c.5224C>T	<i>BRCA1</i>	569	G=546 A=23	G=0.96 A=0.04	0,04
							19	NM_000215.3	c.2419C>T	<i>JAK3</i>	1316	G=1257 A=59	G=0.955 A=0.045	0,045
							X	NM_001164617.1	c.1643-1G>A	<i>GPC3</i>	541	C=517 T=24	C=0.956 T=0.044	0,044

