

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

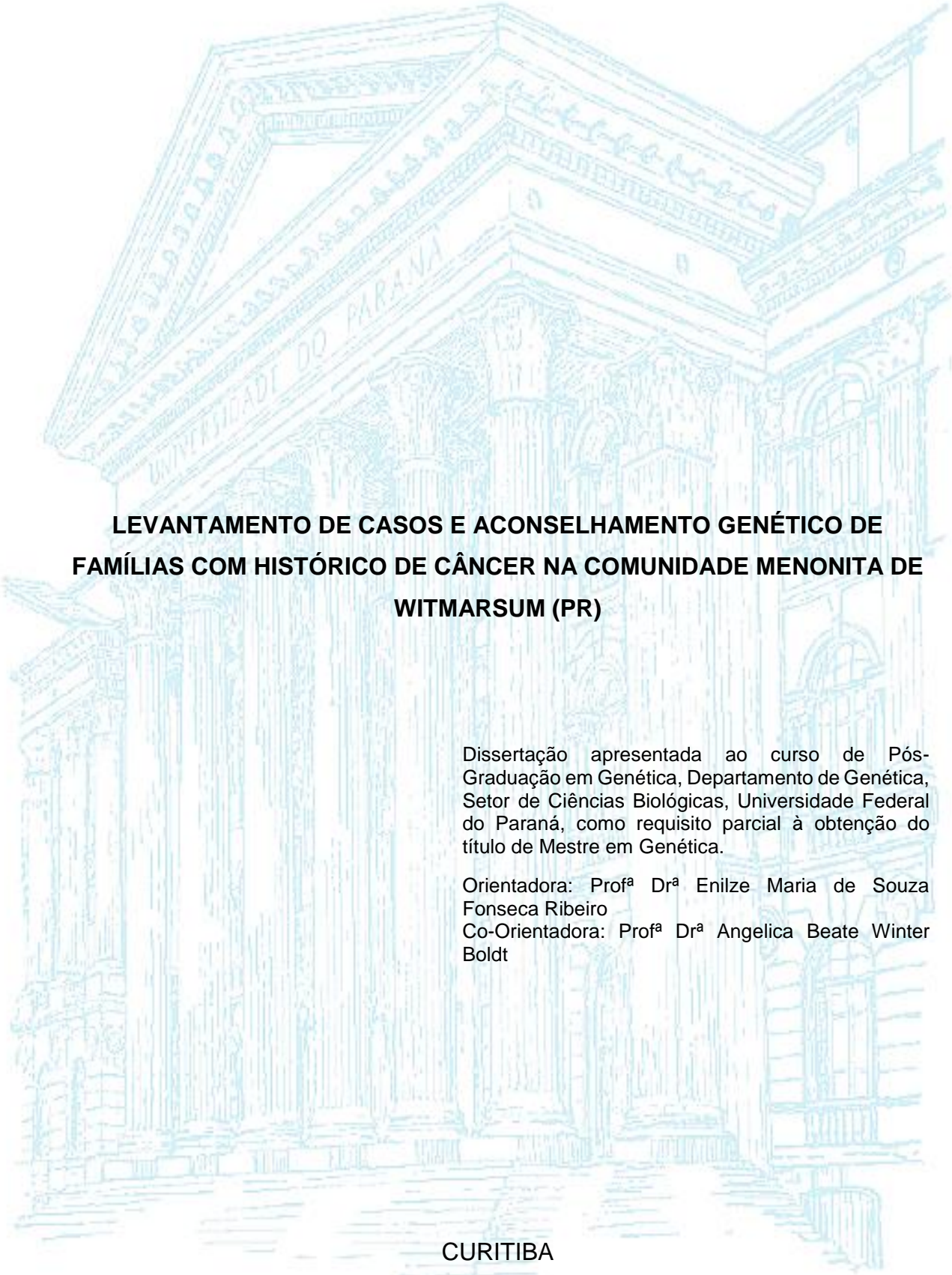
TAYANA SCHULTZ JUCOSKI

**LEVANTAMENTO DE CASOS E ACONSELHAMENTO GENÉTICO DE  
FAMÍLIAS COM HISTÓRICO DE CÂNCER NA COMUNIDADE MENONITA DE  
WITMARSUM (PR)**

CURITIBA

2016

TAYANA SCHULTZ JUCOSKI



**LEVANTAMENTO DE CASOS E ACONSELHAMENTO GENÉTICO DE  
FAMÍLIAS COM HISTÓRICO DE CÂNCER NA COMUNIDADE MENONITA DE  
WITMARSUM (PR)**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Genética, Departamento de Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro

Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Angelica Beate Winter Boldt

CURITIBA

2016

Universidade Federal do Paraná  
Sistema de Bibliotecas

Jucoski, Tayana Schultz

Levantamento de casos e aconselhamento genético de famílias com histórico de câncer na comunidade menonita de Witmarsum (PR)./ Tayana Schultz Jucoski. – Curitiba, 2016.

176f.: il. ; 30cm.

Orientadora: Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro

Co-orientadora: Angelica Beate Winter Boldt

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Aconselhamento genético. 2. Câncer. I. Título II. Ribeiro, Enilze Maria de Souza Fonseca. III. Boldt, Angelica Beate Winter. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

CDD (20. ed.) 575.1

## FOLHA DE APROVAÇÃO



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA  
CENTRO POLITÉCNICO - JARDIM DAS AMÉRICAS - CAIXA  
POSTAL 19071 - CEP 81531-990 - CTBA, BRASIL 41 3361 1587  
PPG-GEN@UFPR.BR



### PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de mestrado de TAYANA SCHULTZ JUCOSKI, intitulada: “Levantamento de casos e aconselhamento genético de famílias com histórico de câncer na Comunidade Menonita de Witmarsum (PR)”, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação.

Curitiba, 25 de novembro de 2016

**Dr.<sup>a</sup> Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro**  
Dep. Genética/UFPR – presidente

**Dr.<sup>a</sup> Maria Luiza Petzl-Erlor**  
Dep. Genética/UFPR

**Dr.<sup>a</sup> Nina Amalia Brancia Pagnan**  
Dep. Genética/UFPR

Dedico este trabalho aos meus pais, Andréa e Edson, que sempre me incentivaram a ir em busca dos meus objetivos

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal do Paraná por proporcionar o desenvolvimento deste mestrado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética, seus professores e funcionários, pelo auxílio e aprendizado adquirido nestes dois anos.

À CAPES, pelo auxílio financeiro.

Às Professoras Dr<sup>a</sup> Enilze M. S. F. Ribeiro e Dr<sup>a</sup> Angélica B. W. Boldt pela orientação, aprendizado e apoio na realização deste trabalho.

Aos professores Dr. Iglénir João Cavalli e Dr<sup>a</sup> Danielle Malheiros Ferreira pelo auxílio ao longo do desenvolvimento do trabalho colaborando para o resultado final.

Ao Instituto Pelé Pequeno Príncipe, em especial ao Dr. Roberto Rosati, pela grande contribuição na realização das técnicas e interpretação dos resultados.

Ao Laboratório Mantis e ao Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade, pela colaboração na execução deste trabalho.

Aos integrantes do Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética pelo apoio, ajuda e amizade.

À minha família, pelo carinho e apoio constante, por sempre acreditarem em mim.

Ao Luca, companheiro compreensivo e sempre disposto a ajudar em todos os momentos.

Aos meus queridos amigos, pelo apoio e estímulo, e também pelos momentos de descontração e alegria.

E, principalmente à Comunidade Menonita da Colônia de Witmarsum, tão receptiva, carinhosa, interessada e disposta a ajudar no desenvolvimento deste trabalho.

*“Dizem que a vida é para quem sabe viver,  
mas ninguém nasce pronto. A vida é para  
quem é corajoso o suficiente para se arriscar  
e humilde o bastante para aprender”*

Clarisse Lispector

## RESUMO

Os Menonitas são um grupo Anabatista cristão que foi perseguido na Europa devido à sua crença, passando a constituir grupos fechados, em que a prática de casamentos consanguíneos se tornou frequente. Ao migrarem para o Brasil formaram comunidades como a Colônia de Witmarsum (PR). O câncer é um conjunto de doenças que apresenta diversas causas e uma grande complexidade podendo ocorrer de forma hereditária, quando uma mutação ocorre na linhagem germinativa e é transmitida ao longo das gerações de uma família dando origem às síndromes familiares. A comunidade de Witmarsum, por intermédio de uma representante, manifestou o desejo de ser estudada devido à percepção de que ali ocorriam muitos casos de câncer. Deste modo, foi proposto um estudo voluntário para se realizar o levantamento dos casos de câncer nas famílias desta comunidade e o aconselhamento genético. Dez famílias se voluntariaram, das quais três preencheram os critérios estabelecidos para síndromes conhecidas, como a Síndrome de Câncer de Mama e Ovário Hereditária (HBOC) em duas famílias e a Neurofibromatose do Tipo 1 (NF1) em uma terceira. Membros destas famílias foram selecionados para análises moleculares, que confirmaram os diagnósticos clínicos. Em ambos os casos foram encontradas mutações que alteram o quadro de leitura levando à produção de proteínas truncadas, sendo c.1961delA em *BRCA1* no indivíduo da família com HBOC e c.3601delT em *NF1* em cinco indivíduos da família com Neurofibromatose do Tipo 1. As demais famílias analisadas não preencheram critérios clínicos para síndromes já descritas e foram classificadas como portadoras de casos esporádicos de câncer.

Palavras-chave: Menonita. Aconselhamento genético. Câncer hereditário.



## ABSTRACT

Mennonites are a Christian Anabaptist group that were persecuted in Europe due to their belief, and since then constitute closed groups, where the practice of consanguineous marriage has become common. In Brazil, they migrated and formed communities such as "Witmarsum Community (PR)". Cancer is a multifactorial and complex group of diseases that can occur in hereditary form, when a germline mutation happens and is transmitted through family generations, giving rise to familial syndromes. The Witmarsum Community, through an agent, expressed the desire to be studied once they have noticed a high number of cancer cases in their population.

In this way, a voluntary study was proposed to carry out the survey of cancer cases in the families of this community and the genetic counseling. Ten families volunteered, of which three met the established criteria for known syndromes. Two families were classified as Hereditary Breast and Ovarian Cancer (HBOC) and one as Neurofibromatosis type 1. Families members were selected for molecular analysis, that confirmed the diagnosis. In both cases were found frameshift mutations, that cause the production of truncated proteins, which are c.1961delT in *BRCA1* in the HBOC family and c.3601delT in *NF1* in the Neurofibromatosis type 1 family. The other families analyzed did not meet clinical criteria for syndromes already described and were classified as presenting sporadic cases of cancer.

Key-words: Mennonite. Genetic counseling. Hereditary cancer

## LISTA DE FIGURA

FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO DA MIGRAÇÃO DOS MENONITAS NO BRASIL .....	17
FIGURA 2 - ESQUEMA DAS DEZ PROPRIEDADES ADQUIRIDAS POR CÉLULAS CANCEROSAS.....	26
FIGURA 3 - CLASSIFICAÇÃO DO CÂNCER COM BASE NA ORIGEM GENÉTICA.....	28
FIGURA 4 - FLUXOGRAMA DAS ETAPAS DESENVOLVIDAS NO PRESENTE ESTUDO.....	38
FIGURA 5 - HEREDOGRAMA DA FAMÍLIA WIT01 .....	51
FIGURA 6 - GRÁFICOS DA PROBABILIDADE DO PROBANDO DA FAMÍLIA WIT01 DESENVOLVER ALGUNS TIPOS DE CÂNCER AO LONGO DA VIDA .....	52
FIGURA 7 - HEREDOGRAMA DA FAMÍLIA WIT03.....	55
FIGURA 8- GRÁFICOS DA PROBABILIDADE DO PROBANDO DA FAMÍLIA WIT03 DESENVOLVER ALGUNS TIPOS DE CÂNCER AO LONGO DA VIDA .....	56
FIGURA 9 - HEREDOGRAMA DA FAMÍLIA WIT04.....	59
FIGURA 10 - GRÁFICOS DA PROBABILIDADE DO PRBANDO DA FAMÍLIA WIT04 DESENVOLVER ALGUNS TIPOS DE CÂNCER AO LONGO DA VIDA.....	60
FIGURA 11 - HEREDOGRAMA DA FAMÍLIA WIT05.....	62
FIGURA 12 - GRÁFICOS DA PROBABILIDADE DO PROBANDO DA FAMÍLIA WIT05 DESENVOLVER ALGUNS TIPOS DE CÂNCER AO LONGO DA VIDA.....	63
FIGURA 13 - HEREDOGRAMA DA FAMÍLIA WIT06.....	65
FIGURA 14 - GRÁFICOS DA PROBABILIDADE DO PROBANDO DA FAMÍLIA WIT06 DESENVOLVER ALGUNS TIPOS DE CÂNCER AO LONGO DA VIDA.....	66
FIGURA 15 - HEREDOGRAMA DA FAMÍLIA WIT07.....	68
FIGURA 16 - GRÁFICOS DA PROBABILIDADE DO PROBANDO DA FAMÍLIA WIT07 DESENVOLVER ALGUNS TIPOS DE CÂNCER AO LONGO DA VIDA.....	69
FIGURA 17 - HEREDOGRAMA DA FAMÍLIA WIT09.....	72

FIGURA 18 - GRÁFICOS DA PROBABILIDADE DO PRBANDO DA FAMÍLIA WIT09 DESENVOLVER ALGUM TIPO DE CÂNCER AO LONGO DA VIDA.....	73
FIGURA 19 - HEREDOGRAMA DA FAMÍLIA WIT10.....	80
FIGURA 20 - GRÁFICOS DA PROBABILIDADE DO PROBANDO DA FAMÍLIA WIT010 DESENVOLVER ALGUM TIPO DE CÂNCER AO LONGO DA VIDA.....	81
FIGURA 21 - HEREDOGRAMA DA FAMÍLIA WIT02.....	85
FIGURA 22 - CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS OBSERVADAS NOS INDIVÍDUOS DA FAMÍLIA MENONITA WIT 02 .....	86
FIGURA 23 - ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS CDS SELVAGEM E MUTADA DA PROTEÍNA NF1 .....	87
FIGURA 24 - SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA NEUROFIBROMINA.....	88
FIGURA 25 - IMAGEM DO GEL DE AGAROSE 1,5% DEMONSTRANDO OS GENÓTIPOS DOS QUATRO INTEGRANTES DA FAMÍLIA WIT 02 .....	89
FIGURA 26 - MODELO 3D DA PROTEÍNA NEUROFIBROMINA NORMAL (À ESQUERDA) E MUTADA (À DIREITA). .....	90
FIGURA 27 - REDES DE INTERAÇÃO DE PROTEÍNAS PARA O <i>NF1</i> CRIADAS PELAS FERRAMENTAS Pathwaylinker (A), STRING (B), GeneMania (C).....	93
FIGURA 28 - INTERAÇÕES DA PROTEÍNA NF1 COM DIFERENTES VIAS DE SINALIZAÇÃO NAS CÉLULAS, INCLUINDO ATIVAÇÃO DE RAS, MODULAÇÃO DA GUANILATO CICLASE, ASSOCIAÇÃO COM MICROTÚBULOS E INTERAÇÃO COM DISTINTOS EFETORES.....	113
FIGURA 29 - VIA DE SINALIZAÇÃO RAS-MAPK E AS RASOPATIAS ASSOCIADAS COM A DESREGULAÇÃO DE VÁRIOS COMPONENTES DESTA VIA.....	120

## LISTA DE QUADRO

QUADRO 1 - DOENÇAS GENÉTICAS ESTUDADAS NA POPULAÇÃO MENONITA GERMÂNICA-HOLANDESA ATÉ 2006.....	22
QUADRO 2 - DISTRIBUIÇÃO PROPORCIONAL DOS DEZ TIPOS DE CÂNCER MAIS INCIDENTES ESTIMADOS PARA 2016-2017 POR SEXO NA POPULAÇÃO BRASILEIRA.....	24
QUADRO 3 - INDICAÇÕES PARA CONSULTA DE ACONSELHAMENTO GENÉTICO.....	33
QUADRO 4 - EXEMPLO DE RESULTADO GERADO PELA ANÁLISE REALIZADA PELO PROGRAMA CANCERGENE.....	40

## LISTA DE TABELA

TABELA 1 - DESCRIÇÃO DOS PRIMERS UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE PCR-ARMS .....	45
TABELA 2 - CONDIÇÕES DE CICLAGEM DA REAÇÃO DE PCR-ARMS .....	46
TABELA 3 - TIPOS DE TUMORES NAS FAMÍLIAS MENONITAS ANALISADAS .....	49
TABELA 4 - PROBABILIDADE DE DESENVOLVIMENTO DE ALGUNS TIPOS DE CÂNCER AO LONGO DA VIDA .....	53
TABELA 5 - PROBABILIDADE DE DESENVOLVIMENTO DE ALGUNS TIPOS DE CÂNCER AO LONGO DA VIDA .....	57
TABELA 6 - PROBABILIDADE DE DESENVOLVIMENTO DE ALGUNS TIPOS DE CÂNCER AO LONGO DA VIDA.....	60
TABELA 7 - PROBABILIDADE DE DESENVOLVIMENTO DE ALGUNS TIPOS DE CÂNCER AO LONGO DA VIDA .....	64
TABELA 8 - PROBABILIDADE DE DESENVOLVIMENTO DE ALGUNS TIPOS DE CÂNCER AO LONGO DA VIDA .....	66
TABELA 9 - PROBABILIDADE DE DESENVOLVIMENTO DE ALGUNS TIPOS DE CÂNCER AO LONGO DA VIDA .....	70
TABELA 10 - PROBABILIDADE DE DESENVOLVIMENTO DE ALGUNS TIPOS DE CÂNCER AO LONGO DA VIDA.....	74
TABELA 11 - VARIANTES ENCONTRADAS EM 34 GENES EM M. L. J (III-3), EXCLUINDO AS SINÔMIMAS. ....	76
TABELA 12 - PROBABILIDADE DE DESENVOLVIMENTO DE ALGUNS TIPOS DE CÂNCER AO LONGO DA VIDA .....	82
TABELA 13 - GENES ANALISADOS NO EXOMA DOS INDIVÍDUOS IV-13 E IV-19 .....	92
TABELA 14 - VARIANTES IDENTIFICADAS EM 42 GENES EM P.M. (IV-19) E D.H (IV-13).....	95
TABELA 15 - VARIANTES IDENTIFICADAS EM 24 GENES EXCLUSIVAMENTE EM P.M.(IV-19) .....	99
TABELA 16 - VARIANTES IDENTIFICADAS EM 19 GENES EXCLUSIVAMENTE EM D.H (IV-13) .....	101

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	14
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	15
2.1 POPULAÇÃO MENONITA	15
2.2 CÂNCER	23
2.2.1 Genética do câncer	24
2.2.2 Síndromes de predisposição ao câncer	27
2.3 ACONSELHAMENTO GENÉTICO	31
<b>3. JUSTIFICATIVA</b>	36
<b>4. OBJETIVOS</b>	37
4.1 Objetivo geral	37
4.2 Objetivos específicos	37
<b>5. MATERIAL E MÉTODOS</b>	38
5.1 ENTREVISTA E ANÁLISE DAS FAMÍLIAS	38
5.2 SELEÇÃO PARA ANÁLISES MOLECULARES	40
5.3 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	41
5.4 EXTRAÇÃO DE DNA	41
5.4.1 Extração de DNA de sangue periférico	41
5.4.2 Extração de DNA de saliva	42
5.5 ANÁLISE DO EXOMA POR SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO (NSG)	42
5.6 IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÃO ESPECÍFICA POR PCR-ARMS	44
5.7 SEQUENCIAMENTO DE SANGER	46
5.8 ANÁLISE DA PROTEÍNA NEUROFIBROMINA	47
<b>6. RESULTADOS</b>	49
6.1 ANÁLISE GERAL DAS FAMÍLIAS MENONITAS	49
6.2 DESCRIÇÃO DAS FAMÍLIAS MENONITAS	50
6.2.1 Família Menonita da Colônia de Witmarsum 1 (Wit 01)	50
6.2.2 Família Menonita da Colônia de Witmarsum 2 (Wit 02)	53
6.2.3 Família Menonita da Colônia de Witmarsum 3 (Wit 03)	54
6.2.4 Família Menonita da Colônia de Witmarsum 4 (Wit 04)	57
6.2.5 Família Menonita da Colônia de Witmarsum 5 (Wit 05)	61
6.2.6 Família Menonita da Colônia de Witmarsum 6 (Wit 06)	64
6.2.7 Família Menonita da Colônia de Witmarsum 7 (Wit 07)	67
6.2.8 Família Menonita da Colônia de Witmarsum 9 (Wit 09)	70
6.2.9 Família Menonita da Colônia de Witmarsum 10 (Wit10)	79

6.2.10 Família Menonita da Colônia de Witmarsum 2 (Wit02) .....	82
6.3 ANÁLISE DA PROTEÍNA NEUROFIBROMINA .....	89
6.4 ANÁLISE DO EXOMA DA FAMÍLIA WIT 02 .....	91
<b>7. DISCUSSÃO .....</b>	<b>103</b>
7.1 Famílias Menonitas com histórico de câncer .....	103
7.2 Síndrome de Câncer de Mama e Ovário Hereditários (HBOC).....	105
7.3 Neurofibromatose do Tipo 1 .....	109
<b>8. CONCLUSÃO .....</b>	<b>121</b>
<b>9. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>122</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>123</b>
<b>APÊNDICE A - QUESTIONÁRIO DE ACONSELHAMENTO GENÉTICO EM CÂNCER .....</b>	<b>145</b>
<b>APÊNDICE B – EXEMPLOS DE LAUDOS ENTREGUE ÀS FAMÍLIAS MENONITAS PARTICIPANTES .....</b>	<b>158</b>
<b>APÊNDICE C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....</b>	<b>162</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Os Menonitas são um grupo Anabatista cristão, que surgiu no século XVI. Perseguidos na Europa devido à sua crença, passaram a constituir grupos fechados, em que a prática de casamentos consanguíneos se tornou frequente. Em busca de liberdade, migraram para diversos países, entre eles o Brasil. Aqui, formaram comunidades como a Colônia de Witmarsum, no Estado do Paraná, onde desenvolveram uma cooperativa agropecuária. Estudos de associação genética a doenças e de genética de populações têm sido realizados nesta população, a fim de compreender sua estrutura genética e o componente genético de algumas doenças. Dentre estas, destaca-se o câncer familiar/hereditário.

O câncer é um conjunto de doenças que tem sido foco de estudos nos últimos anos por apresentar diversas causas e uma grande complexidade. As estimativas de casos de câncer têm aumentado a cada ano, sendo que para o ano de 2030 foram estimados 21,4 milhões de novos casos no mundo (GLOBOCAN, 2012). Tal aumento na taxa de detecção de câncer está relacionado com a aplicação de exames preventivos e envelhecimento da população. O câncer é decorrente de alterações no material genético das células que levam à desregulação da sua homeostase e de processos como crescimento e divisão celular, promovendo um desenvolvimento descontrolado o que permite a formação de tumor. Esta doença pode se apresentar de forma esporádica ou hereditária, nesta uma mutação está presente na linhagem germinativa e é transmitida ao longo das gerações de uma família. O câncer hereditário muitas vezes é componente de síndromes familiares e o aconselhamento genético se mostra necessário. O conhecimento da história familiar e os cálculos de risco para o desenvolvimento desta e outras doenças associadas permite a tomada de decisões com relação, por exemplo, a estratégias de tratamento, alteração do estilo de vida e questões relacionadas à reprodução que podem ser adotadas visando a redução dos riscos. Assim sendo, este trabalho tem por objetivo realizar o levantamento dos casos de câncer nas famílias da comunidade Menonita de Witmarsum (PR), a análise molecular de indivíduos selecionados e realizar o aconselhamento genético nesta colônia.



## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 POPULAÇÃO MENONITA

Grupos Anabatistas, como os Amish, Hutteritas e Menonitas representam populações compostas por pequeno número de indivíduos, geralmente derivadas de efeitos de gargalo, onde uma população inicial maior, por algum motivo, foi reduzida e/ou dividida. Estas populações comumente vivem separadas geograficamente e/ou culturalmente de outras por muitas gerações, e a maioria ainda apresenta pouca miscigenação com outras culturas, como algumas comunidades Amish e Hutteritas na América do Norte e Menonitas na Bolívia e Paraguai. Estas comunidades mostram-se interessantes para estudos populacionais e genéticos, principalmente no contexto das doenças hereditárias, uma vez que, além do isolamento local/cultural, provêm de um pequeno número de fundadores há relativamente poucas gerações; apresentam homogeneidade ambiental e fenotípica; relações de consanguinidade e endogamia recorrentes; e registros detalhados das famílias que compõem a comunidade, permitindo a construção de heredogramas multigeracionais (ARCOS-BURGOS; MUENKE, 2002).

Os Menonitas são um grupo cristão que tem sua origem no movimento Anabatista (que significa “batizar de novo”) da época da Reforma no século XVI (1525), na Suíça, onde um grupo de estudiosos protestantes percebeu que apenas indivíduos que tinham idade suficiente para ter convicção de sua fé deveriam ser batizados, com base nessa fé e no compromisso de viver segundo a palavra de Deus (PENNER *et al.*, 1984; MASKE, 1999). O termo Menonita, tem origem no nome do padre holandês Menno Simons (1496-1561) que em seus escritos foi um dos principais responsáveis por formalizar os ensinamentos Anabatistas e instaurar o pacifismo. O termo “Menonita” também se refere aquele indivíduo que pertence a um grupo cuja religião é evangélica livre, pratica o batismo adulto e renuncia ao serviço de guerra (THIESSEN, 2003).

Os descendentes dos Menonitas deste período compõem dois grandes grupos: os holandeses-alemães, que atualmente vivem principalmente na América Latina e no oeste do Canadá, e os suíços-alemães, que vivem

principalmente no estado da Pensilvânia (Estados Unidos) e em Ontário (Canadá). Além disso, a grande maioria dos Menonitas hoje são convertidos na África formando um novo grupo sem relação de descendência com os originais (ORTON *et al.*, 2008).

Ainda no século XVI, o movimento Anabatista passou a ser usado para representar a revolta popular contra o clero e a nobreza, motivando guerras civis. Por esta razão, os Menonitas passaram a ser perseguidos na Suíça, Alemanha e Holanda, necessitando se refugiar na Prússia, onde construíram uma sólida reputação como bons trabalhadores rurais e pagadores de impostos. Diante disso buscavam se estabelecer em regiões pouco habitadas formando colônias isoladas e autossuficientes reduzindo o contato com o mundo exterior. Em meados do século XVII, diversos grupos optaram por migrar para a Ucrânia, recém-adquirida do Império Otomano pela Rússia, onde lhes foi garantida a liberdade religiosa e a isenção do serviço militar, podendo assim formar comunidades agrícolas. Contudo, não poderiam evangelizar sua fé e deveriam se casar apenas entre si, levando à ocorrência de endogamia e consanguinidade (PENNER *et al.*, 1984; DÜCK, 2005; ORTON *et al.*, 2008;).

Após quase 250 anos vivendo na Prússia, os Menonitas passaram a iniciar, novamente, a busca por terras que lhes garantissem liberdade religiosa. A imperatriz Catarina II, entre o final do século XVIII e início de XIX, os convidou para viverem no sul da Rússia. Assim durante 150 anos viveram neste país em comunidades isoladas com autonomia civil onde conseguiram desenvolver um sistema sociocultural baseado em sua fé. Após a revolução de 1917, na Rússia, apresentavam a imagem de “inimigos do povo” por causa de sua religião e por serem donos de propriedades produtivas, o que reiniciou sua perseguição. Em 1929, aproximadamente 5000 Menonitas fugiram com ajuda de Menonitas alemães e canadenses. Tinham como principal destino o Canadá, mas nem todos obtiveram permissão para entrar no país uma vez que o governo passou a ser mais restritivo com imigrantes, sendo encaminhados para o Paraguai – cerca de 2800 pessoas, e para o Brasil – 1200 pessoas (PAULS JUNIOR, 1980). O Paraguai oferecia vários privilégios além da liberdade religiosa, como administração independente das colônias, isenção do serviço militar e estabelecimento de um sistema educacional próprio. Contudo, na época era um país pouco desenvolvido e apenas algumas famílias decidiram ir para lá.

No Brasil, inicialmente se fixaram no estado de Santa Catarina, criando a Colônia Krauel, composta por três núcleos: Waldheim, Gnadental e Witmarsum. As famílias que chegaram por último, passaram a se instalar na Serra do Mirador, denominada Stolz-Plateau, formando o núcleo de Auhagen. Entretanto nos anos iniciais muitas dificuldades surgiram principalmente com relação ao manejo da terra e problemas na colheita de batata doce, milho e mandioca (SIEMENS, 1984). Assim perceberam que ali o solo não era muito produtivo e algumas famílias foram em busca de terras melhores emigrando para outras regiões do país, como Rio Grande do Sul, Paraná, São Paulo, Mato Grosso, Bahia e Amazonas, onde formaram vilas e cooperativas, passando a viver em comunidades relativamente fechadas (FIGURA 1). Estas comunidades, se tornaram importantes contribuintes para o crescimento do país no setor econômico e de assistência social (PAULS JUNIOR, 1980).

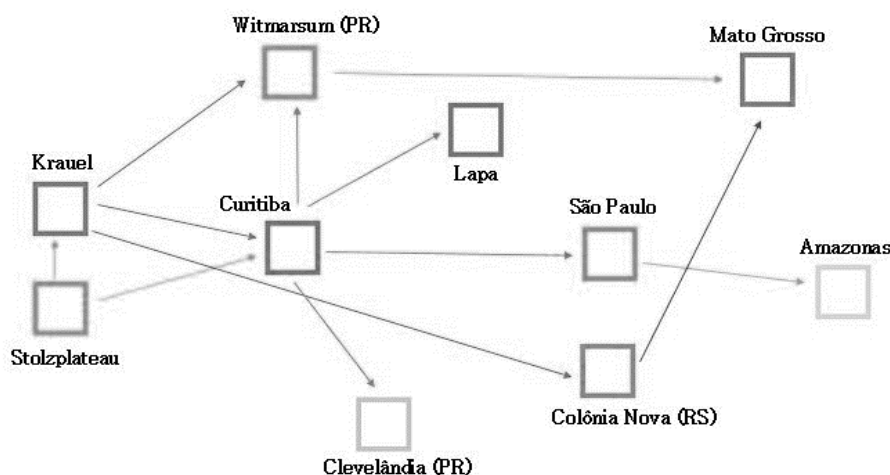


FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO DA MIGRAÇÃO DOS MENONITAS NO BRASIL.

FONTE: Adaptado de PAULS JUNIOR (1980).

Em 1949, diversas famílias, principalmente da Colônia de Krauel, foram para o estado do Rio Grande do Sul, onde fundaram a Colônia Nova, nas proximidades da cidade de Bagé. Anos antes, no Paraná, as famílias se estabeleceram na região de Curitiba onde atualmente estão localizados os bairros do Xaxim, Boqueirão, Vila Guaíra e Água Verde. Em 1933, viviam na cidade cerca de seis famílias Menonitas, sendo duas vindas de Stoltz-Plateau,

duas da Colônia Witmarsum-Krauel e duas do Paraguai. Posteriormente, retirantes do núcleo de Auhagen também chegaram à região. Com o passar dos anos, cada vez mais famílias foram chegando e passaram a se dedicar à produção de leite (PAULS JUNIOR, 1980). Atualmente, o maior grupo de Menonitas no Brasil está em Curitiba. Em 1951, 74 famílias Menonitas adquiriram a Fazenda Cancela no município de Palmeira, próximo a Curitiba, onde fundaram a Colônia Witmarsum dando origem a uma cooperativa mista agropecuária (PAULS JUNIOR, 1976).

“*Witmar*” significa “famoso das florestas” em frísio e “*Sum*”, um sufixo, quer dizer “chácara”, portanto o nome dado a colônia de Witmarsum significa “chácara do *Witmar*”, ou seja, a “chácara do famoso das florestas” (NIKKEL; KLIEWER; 1991). Além disso, Witmarsum é o nome da cidade catarinense de onde a maioria de seus fundadores migraram na década de 50 e de uma pequena cidade na Frísia (norte da Holanda) onde Menno Simons nasceu. As terras desta colônia apresentam cerca de 7.800 hectares inicialmente divididas em 128 chácaras. Posteriormente houve a divisão em cinco aldeias, numeradas de 1 a 5, dispostas ao redor do centro administrativo, comercial e social localizado na sede da antiga fazenda e atual Museu Histórico Casa Fazenda Cancela.

Em 1965 foi realizado um levantamento dos habitantes Menonitas na colônia pelo sociólogo Minnich, contabilizando 127 famílias (691 indivíduos) e em 1979 passaram para 167 famílias (769 indivíduos). Nesta época 28 famílias moradoras da colônia não possuíam ascendência Menonita. Na década de 90 o número de moradores Menonitas atingiu 1.086 indivíduos. Com o passar do tempo, o número de trabalhadores não-Menonitas foi aumentando, assim como os casamentos entre Menonitas e não-Menonitas (*apud* KLASSEN, 1998). Segundo os dados fornecidos numa circular de 2001 da Associação Comunitária dos Moradores Proprietários de Witmarsum, 1.599 pessoas viviam na colônia sendo que 1.183 eram de ascendência Menonita. A Associação Comunitária dos Moradores Proprietários de Witmarsum foi criada para ajudar na manutenção do ensino da pré-escola ao ensino médio, a escola de música, o museu histórico, o atendimento médico-hospitalar, farmacêutico e odontológico, atividades esportivas e outras modalidades de desenvolvimento cultural. Além disso a colônia possui uma forte vertente religiosa, já que esta é um dos três pilares que a mantém sendo os demais a escola e a cooperativa (PAULS JUNIOR, 1976). A

base econômica da colônia desde sua fundação é a agropecuária sobretudo no ramo de leite, distribuído principalmente em Curitiba e Ponta Grossa. Ainda há criação de frangos e porcos para o abate e plantações de soja e milho. A Colônia de Witmarsum exibe um forte turismo baseado, principalmente, na produção de leite e queijos, nos diversos cafés coloniais e no turismo rural.

A colônia possui um Museu Histórico, a Igreja Evangélica Menonita e a Igreja Evangélica Irmãos Menonitas, colégio e escola de música, hotéis e pousadas, cafés coloniais e restaurantes, um centro cultural recreativo, parque de exposições da Cooperativa, as famosas Estrias Glaciais, além de hospital, farmácia, posto policial, agências bancária e de correio, um supermercado da Cooperativa, posto de abastecimento, de informações turísticas e um cemitério.

Os Menonitas normalmente seguem rigorosamente sua doutrina e fé. Os casamentos consanguíneos tornaram-se inevitáveis, devido ao isolamento imposto à sua comunidade, especialmente em gerações anteriores, na Europa. Deste modo, representam uma comunidade bem definida, com maior homogeneidade genética, casos de consanguinidade e, conseqüentemente, de descendentes homozigotos e agregação de doenças autossômicas recessivas muitas delas atribuídas ao efeito fundador (JAWORSKI *et al.*, 1988). Diante disso, diversos estudos com relação à frequência de polimorfismos, por exemplo, têm sido realizados em Menonitas.

Boschmann e colaboradores (2012) investigaram a frequência dos polimorfismos  $LCT^*-13910 C>T$  e  $LCT^*-14010 G>C$ , associados à persistência da lactase, nas populações Menonita e Euro-brasileira não-Menonita do Sul do Brasil. Estes autores observaram que 45% dos Euro-brasileiros apresentam o genótipo  $LCT^*-13910 C/C$ , marcador para hipolactasia primária, comparado a somente 12% dos Menonitas. Logo, a persistência da lactase chega a 88% na população Menonita, comparado a somente 55% dos Euro-brasileiros não-Menonitas.

Doherty e colaboradores (2012) identificaram a variante c.1473delG no gene *GPSM2*, como variante causal para a Síndrome de Chudley-McCullough (CMS), que apresenta herança autossômica recessiva e é caracterizada por perda auditiva neurossensorial profunda e anomalias cerebrais, em pacientes com ancestralidade Menonita. O mesmo foi encontrado por Almomani e colaboradores (2012), ao analisarem variantes neste gene relacionadas à CMS

em Menonitas Norte-americanos. Assim, sugeriram que a mutação c.1473delG em *GPSM2* associada à CMS parece ser uma mutação fundadora antiga, que foi trazida à América do Norte por colonos Menonitas originários da Europa Ocidental.

Os resultados obtidos por Alvarado-Esquivel e Delanghe (2007) indicam um efeito fundador com relação aos fenótipos de haptoglobina (Hp) numa população mexicana de Menonitas onde a frequência do alelo Hp\*1 (0,317) apresentou-se distinta da encontrada na população alemã (0,460) de onde originaram-se. Os autores relacionaram tal resultado com a migração da população Menonita dentro da Europa, principalmente no leste onde se fixaram na Rússia e subsequente estabelecimento nas Américas.

Boldt e colaboradores (2009) analisaram a diversidade da região codificadora do gene do receptor da quimiocina CC (*CCR5*) em cinco populações da América do Sul. Encontraram dois novos alelos não sinônimos em Ameríndios e uma alta frequência de *CCR5*\*D32 na população de Euro-brasileiros. Com relação à população Menonita, em uma subamostra dos Euro-brasileiros, encontraram uma frequência duas vezes maior (14,2%) se comparada com a subamostra de Euro-brasileiros não Menonitas, porém parecida com a frequência encontrada no norte europeu. Assim, sugerem que um efeito fundador ou de gargalo associado à deriva genética teria levado ao aumento da frequência alélica de *D32* nesta população.

Na província de Manitoba no Canadá, diversas famílias Menonitas foram relatadas com câncer de cólon não-polipomatoso hereditário (HNPCC) ou Síndrome de Lynch. A mutação p.Trp714X no gene *MLH1* foi encontrada em todas estas famílias, sugerindo um possível evento de efeito fundador, uma vez que não eram diretamente relacionadas. O gene mutado nestas famílias apresentou uma penetrância de 40 a 60% e a idade média de diagnóstico de HNPCC por volta dos 40 anos (ORTON, 2008).

A anemia de Fanconi (AF) é uma desordem hereditária decorrente de instabilidade cromossômica, associada à falência da medula óssea e predisposição ao câncer. Em alguns grupos étnicos, a incidência de AF é maior do que 1:130.000 geralmente encontrado na população, devido ao isolamento genético e efeito fundador presente em algumas comunidades fechadas. Vries e colaboradores (2012) estudaram 15 indivíduos Norte-americanos portadores da

mutação c.67delG no gene *FANCC* relacionado com AF, sendo que 11 eram homozigotos, com ancestralidade holandesa e parentesco com Menonitas de Manitoba no Canadá. Ao realizarem a investigação genealógica, observaram que os ancestrais destes indivíduos vieram de quatro áreas da Holanda, sendo que estes apresentaram o mesmo haplotipo, indicando a possibilidade de um ancestral comum. Levando em conta também a existência de consanguinidade, os autores consideraram esta mutação como sendo uma mutação fundadora holandesa e assim sugeriram que a frequência de portadores da mutação c.67delG em *FANCC* na população Norte-americana Menonita é maior do que o esperado para uma doença recessiva rara como a Anemia de Fanconi.

Nakamura e colaboradores (2014) estudaram dez indivíduos Menonitas que apresentavam a mutação sem sentido c.6200C>A no gene *ATM*, considerada como sendo uma mutação exclusiva da população Menonita. Estes indivíduos exibiam uma variante fenotípica de ataxia-telangiectasia (AT). Diversos deles desenvolveram câncer e em sequência, reações adversas à radioterapia e/ou quimioterapia.

Há muitos outros estudos genéticos realizados na população Menonita, como, por exemplo, em relação à deficiência do fator intrínseco gástrico (FERRAND *et al.*, 2014), quanto ao risco de esclerose múltipla (LAUER, 2006), para várias doenças hereditárias (JAWORSKI *et al.*; 1989), Síndrome de Alström (COLLIN *et al.*; 2002), Síndrome de depleção mitocondrial hepatocerebral (TADIBOYINA *et al.*; 2005), entre outros ilustrados no quadro 1.

QUADRO 1 - DOENÇAS GENÉTICAS ESTUDADAS NA POPULAÇÃO MENONITA GERMÂNICA-HOLANDESA ATÉ 2006.

Doença	Gene	Genótipo <sup>a,b</sup>	Alteração na proteína	Grupo/País	Referência
Síndrome de Alaström	<i>ALMS1</i>	Desconhecido	Desconhecido	Não informado	Collin <i>et al.</i> (2002)
Síndrome de excesso aparente de mineralocorticóides	<i>HSD11B2</i>	c.680C>T	Pro277Leu	Não informado	Wilson <i>et al.</i> (1998)
Ataxia-telangiectasia	<i>ATM</i>	c.5932G>T	Glu1978X	Não informado	Campbell <i>et al.</i> (2003)
Fenda palatina com anquiloglossia	<i>TBX22</i>	c.354G>T	Gly118Cys	Manitoba - Canadá	Braybrook <i>et al.</i> (2001)
Displasia cleidocranial	<i>CBFA1</i>	c.598A>G	Thr200Ala	Não informado	Zhou <i>et al.</i> (1999)
Hiperplasia adrenal congênita	<i>CYP17</i>	c.1434_1437dupCATC	Pro482HisfsX27	Canadá	Kagimoto <i>et al.</i> (1989)
Cegueira noturna estacionária congênita	<i>CACNA1F</i>	c.3166dupC	Leu1056ProfsX11	Canadá	Bech-Hansen <i>et al.</i> (1998b)
Fibrose cística	<i>CFTR</i>	Desconhecido <sup>c</sup>	Desconhecido	Chortitza - Canadá	Jaworski <i>et al.</i> (1988, 1989a)
Cardiomiopatia hipertrófica familiar	<i>MYBPC3</i>	c.2373-237insG	Trp791fs	Não informado	Niimura <i>et al.</i> (1998)
Grupo sanguíneo Froese	<i>SLC4A1</i>	c.1438G>A	Glu480Lys	Não informado	McManus <i>et al.</i> (2000)
Síndrome de depleção mitocondrial hepatocerebral	<i>DGUOK</i>	c.763G>T	Asp255Tyr	Chortitza - Canadá	Tadiboyina <i>et al.</i> (2005)
Câncer de cólon não polipomatoso hereditário	<i>MLH1</i>	c.2141G>A	Trp714X	Não informado	Orton <i>et al.</i> (2008)
Hipofosfatasia (perinatal) infantil	<i>ALPL</i>	c.1001G>A	Gly334Asp	Canadá	Greenberg <i>et al.</i> (1993)
Hipofosfatasia juvenil/adulta	<i>ALPL</i>	c.[1001G>A]+[571G>]	[Gly334Asp]+[Glu191Lys]	Canadá	Greenberg <i>et al.</i> (1993)
Síndrome de Leigh	<i>MT-RNR2</i>	m.3197T>C		Não informado	Huntsman <i>et al.</i> (2005)
Hipertermia maligna	<i>RYR1</i>	c.1840C>T	Arg614Cys	Manitoba - Canadá	Serfas <i>et al.</i> (1996)
Síndrome de Renpenning	<i>PQBP1</i>	c.640_641insC	Arg214ProfsX13	Não informado	Lenski <i>et al.</i> (2004)
Dermopatia restritiva	<i>ZMPSTE24</i>	c.54dupT	Ile19TyrX28	Não informado	Moulson <i>et al.</i> (2005)
Focomelia de Roberts/SC	<i>ESCO2</i>	Desconhecido	Desconhecido	Não informado	Vega <i>et al.</i> (2005)
Imunodeficiência combinada severa	<i>ZAP70</i>	c.1624-11G>A	K540_K541insLEQ	Não informado	Arpaia <i>et al.</i> (1994)

<sup>a</sup> Utilizando nomenclatura padronizada, onde o primeiro nucleotídeo (+1) corresponde ao A do ATG e o primeiro códon de iniciação é o ATG.

<sup>b</sup> Designações da nomenclatura podem ter mudado a partir da publicação original.

<sup>c</sup> Ambas as mutações, F508 e 394delTT foram observadas nos pacientes menonitas do artigo do qual a tabela foi retirada.

FONTE: Adaptado de ORTON *et al.* (2008).



## 2.2 CÂNCER

A palavra câncer foi empregada pela primeira vez por volta de 400 a.C. pelo pai da medicina, Hipócrates (460–377 a.C.) e tem origem no grego, *karkínos*, que significa caranguejo. A associação da doença com este crustáceo deve-se a imagem de um tumor rodeado por vasos sanguíneos que Hipócrates se deparou, imaginando-o um caranguejo. Tempos depois outros incluíram mais associações como o aspecto endurecido e desbotado que se assemelhava à carapaça, pontadas de dor comparadas com o aperto das garras ou ainda relatos de indivíduos que sentiam o “animal” se mexer em seu corpo como se o câncer estivesse se espalhando (MUKHERJEE, 2011).


Atualmente a palavra câncer é a denominação dada a um conjunto de mais de 100 doenças que tem em comum o crescimento desordenado e rápido das células, resultando na formação de tumores e na aquisição da capacidade de invadir tecidos e órgãos formando metástases. Resulta de um acúmulo de mutações gênicas e cromossômicas, além de alterações epigenéticas e ação de fatores ambientais que levam ao aumento da taxa de proliferação e do dano celular, passando a interferir no sistema responsável pelo crescimento e morte celular (NUSSBAUM *et al.*, 2001; VIEIRA *et al.*, 2008).

Segundo estimativas do Projeto Globocan, da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer, houveram 14,1 milhões de novos casos de câncer e um total de 8,2 milhões de mortes por câncer, em 2012. Para o ano de 2030, a estimativa global de novos casos de câncer é de 21,4 milhões e 13,2 milhões de mortes por esta doença. Esse aumento nas estatísticas está relacionado com alguns fatores como o crescimento e envelhecimento da população, a redução da mortalidade infantil e das mortes por doenças infecciosas nos países em desenvolvimento (INCA, 2014).

No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima para o período de 2016-2017 uma ocorrência de aproximadamente 600 mil novos casos de câncer, incluindo aqueles de pele do tipo não melanoma que será o mais incidente na população brasileira com 180 mil novos casos. O câncer de próstata será o mais frequente entre os homens com cerca de 61 mil novos casos (28,6%) e o câncer de mama entre as mulheres com aproximadamente 58 mil novos casos (28,1%). Entre os dez tipos de câncer mais incidentes para este período entre os homens

estão aqueles de traquéia, brônquios e pulmão com a estimativa de 17.330 novos casos (8,1%) e de cólon e reto com 16.660 novos casos (7,8%). Já entre a população feminina o câncer de cólon e reto apresentará 17.620 novos casos (8,6%) e o câncer de cólon do útero terá 16.340 novos casos (7,9%) sendo alguns dos tipos mais frequentes entre os dez listados para as mulheres (QUADRO 2).

QUADRO 2 - DISTRIBUIÇÃO PROPORCIONAL DOS DEZ TIPOS DE CÂNCER MAIS INCIDENTES ESTIMADOS PARA 2016-2017 POR SEXO NA POPULAÇÃO BRASILEIRA\*

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
			<b>Homens</b>	<b>Mulheres</b>	Mama feminina	57.960	28,1%
Próstata	61.200	28,6%			Cólon e Reto	17.620	8,6%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	8,1%			Colo do útero	16.340	7,9%
Cólon e Reto	16.660	7,8%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%
Estômago	12.920	6,0%			Estômago	7.600	3,7%
Cavidade Oral	11.140	5,2%			Corpo do útero	6.950	3,4%
Esôfago	7.950	3,7%			Ovário	6.150	3,0%
Bexiga	7.200	3,4%			Glândula Tireoide	5.870	2,9%
Laringe	6.360	3,0%			Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%
Leucemias	5.540	2,6%			Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%
Sistema Nervoso Central	5.440	2,5%					

\*Números arredondados para múltiplos de 10.

\*Excetuando-se os casos de câncer de pele não melanoma.

FONTE: INCA, 2016.

### 2.2.1 Genética do câncer

Uma célula normal pode sofrer alterações no DNA que promovem modificações de genes importantes e conseqüentemente promovem um processamento errado de informações genéticas, podendo alterar algumas de suas atividades transformando-a em uma célula neoplásica. Assim sendo, o câncer é considerado um conjunto de doenças com heterogeneidade genética com acúmulo de mutações que alteram as funções básicas da célula, que adquire novos comportamentos e propriedades, podendo causar erros nos processos bioquímicos conduzindo à uma proliferação desregulada. Entre as alterações gênicas que as células cancerosas podem apresentar estão rearranjos, deleções, amplificações e mutações de ponto que são responsáveis por transformar a expressão dos chamados proto-oncogenes e genes supressores de tumor (STORCHOVA; PELLMAN, 2004). Estas duas classes de

genes, quando mutadas, contribuem para o estabelecimento e desenvolvimento de células cancerosas.

Os proto-oncogenes tem grande importância para a regulação do ciclo celular e, portanto, estão associados aos processos de crescimento, proliferação e diferenciação das células regulando-as positivamente. Mutações de ponto, translocações e amplificações, nesta classe de genes dão origem aos oncogenes cujos produtos alterados permitem a ativação contínua e independente de estímulos externos dos processos mencionados. Geralmente são mutações de caráter dominante, ou seja, basta um alelo mutado para que o fenótipo neoplásico seja desenvolvido. São proto-oncogenes os genes *ERBB2* (*HER2*) e *RAS*, por exemplo (AMENDOLA; VIEIRA, 2005; WEINBERG, 2008).

Os genes supressores de tumor atuam como reguladores negativos principalmente da proliferação celular. São divididos em duas classes: os “*caretakers*”, que suprimem indiretamente o crescimento tumoral ao codificarem proteínas que operam na manutenção da integridade genômica, e os “*gatekeepers*”, que regulam negativamente a proliferação celular e/ou positivamente a morte celular programada (apoptose) protegendo a célula de um crescimento desordenado. No caso dos genes supressores de tumor ambos os alelos necessitam estar mutados e, portanto, inativados para favorecer o desenvolvimento neoplásico. São exemplos de genes supressores de tumor *BRCA1*, *BRCA2* e *TP53* (MACLEOD, 2000; AMENDOLA; VIEIRA, 2005, WEINBERG, 2008).

Hanahan e Weinberg (2000) enumeraram algumas propriedades que as células cancerosas podem adquirir ao longo do processo de carcinogênese. As propriedades adquiridas pelas células para manutenção do processo maligno seriam 1-autossuficiência nos processos que estimulam a divisão e o crescimento celular; 2- insensibilidade aos sinais inibidores de crescimento; 3- desvio da morte celular programada; 4-aquisição de potencial ilimitado de replicação; 5-desenvolvimento de mecanismos de auto-nutrição (angiogênese); e 6-capacidade de invadir e colonizar outros tecidos (metastatização). Em um segundo estudo dos mesmos autores (HANAHAN; WEINBERG, 2011) foram acrescentadas mais quatro propriedades, sendo elas: instabilidade genômica e mutação, evasão do sistema imune, desregulação do metabolismo energético e promoção de inflamação inicial (FIGURA 2).



FIGURA 2 - ESQUEMA DAS DEZ PROPRIEDADES ADQUIRIDAS POR CÉLULAS CANCEROSAS.

FONTE: Adaptado de HANAHAN; WEINBERG (2011).

As dez propriedades que podem ser adquiridas pelas células cancerosas ao longo da carcinogênese propostas por Hanahna e Weimberg (2000; 2011) estão interligadas, uma vez que a aquisição de uma permite o desenvolvimento de outras. Por exemplo, a capacidade de evadir do sistema imune permite que células cancerosas consigam acessar os vasos sanguíneos e linfáticos e migrar para outros tecidos onde formarão colônias e desenvolverão um tumor secundário. Portanto, ao conseguirem escapar do sistema imune estas células conseguem estabelecer metástases que por sua vez irão exigir a formação de vasos sanguíneos para a sua nutrição e excreção através do processo de angiogênese e poder de replicação infinita para conseguir crescer, sendo estas outras propriedades enumeradas por Hanahna e Weimberg (2000).

O entendimento desse processo múltiplo permite uma melhor compreensão de como as células neoplásicas iniciais se comportam e se tornam tumorigênicas e depois malignas (HANAHAN; WEINBERG, 2000). A grande dificuldade existente em combater as neoplasias está relacionada com a complexidade destas propriedades que estão interligadas e a maneira como ocorre a manipulação dos processos celulares normais para manter sua sobrevivência. Assim, conhecer o modo que agem e se comportam em nível

mais refinado é necessário para que se possa elaborar estratégias para combater estas células.

Nos últimos anos a pesquisa sobre o câncer tem avançado em diversas vertentes elucidando cada vez mais as bases moleculares de seu desenvolvimento e tratamento, revelando que o câncer se apresenta como uma doença que envolve diversas mudanças dinâmicas no genoma. Além disso, tem fornecido instrumentos para o diagnóstico molecular, monitoramento e identificação de alvos terapêuticos.

### 2.2.2 Síndromes de predisposição ao câncer

O câncer pode ser classificado com base na origem genética, podendo ser esporádico, familiar ou hereditário (FIGURA 3). O câncer esporádico compreende a maioria dos casos (70-80%) uma vez que os danos genéticos são adquiridos ao longo da vida do indivíduo. Este tipo de câncer exhibe alterações somáticas em genes importantes, como oncogenes, genes supressores de tumor, incluindo os genes atuantes nas vias de reparo do DNA, que permitem seu desenvolvimento, mas conferem um baixo risco de recorrência familiar (NAGY; SWEET; ENG, 2004; TREPANIER *et al.*, 2004).

O câncer familiar corresponde a cerca de 15 a 20% dos casos diagnosticados e caracteriza-se pela recorrência familiar de algumas formas comuns de câncer acima do esperado, exibindo características multifatoriais e a ocorrência de diversos tipos de tumores decorrentes de mutações em genes de baixa penetrância. Neste caso considera-se a existência de fatores de risco que conferem uma maior suscetibilidade, que é herdada, em desenvolver determinados tipos de câncer e a ocorrência de exposição a um mesmo fator ambiental. Os parentes mais próximos apresentam um maior risco de desenvolver determinados tipos de câncer, porém a média de idade de surgimento é, geralmente, semelhante àquela observada para a população em geral (NAGY; SWEET; ENG, 2004; TREPANIER *et al.*, 2004).

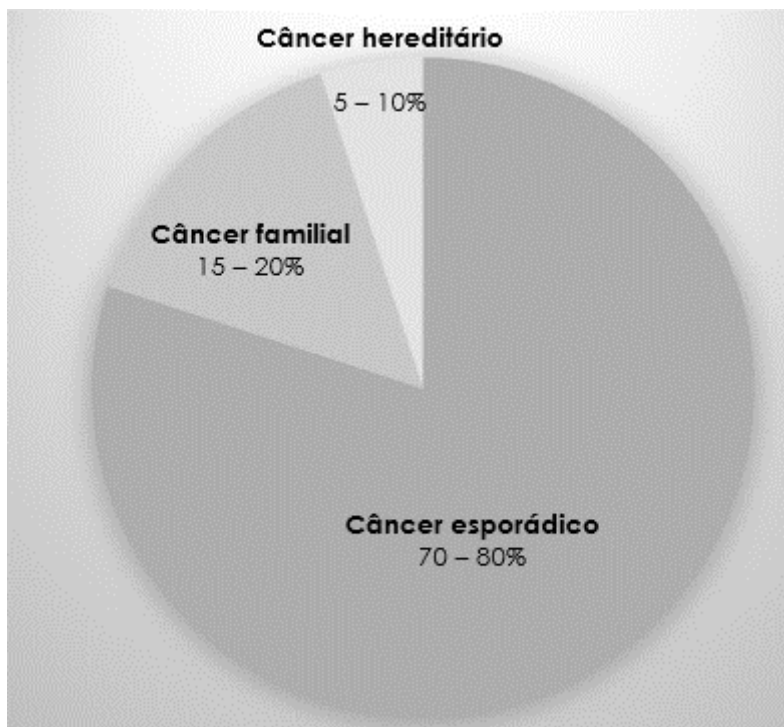


FIGURA 3 - CLASSIFICAÇÃO DO CÂNCER COM BASE NA ORIGEM GENÉTICA.

FONTE: Adaptado de *Staten Island University Hospital* (2016).

O câncer hereditário afeta famílias e é caracterizado por síndromes geneticamente bem definidas, produzindo alto risco de desenvolvimento de tumores malignos e/ou benignos em idade precoce decorrente de mutações em genes de alta penetrância, ou seja, o indivíduo portador da mutação possui um risco elevado de desenvolver lesões associadas à síndrome durante toda a vida, portanto apresentando maior risco de desenvolver mais de um tumor primário. É resultado de alterações genéticas transmitidas verticalmente dentro das famílias, ou seja, de uma geração a outra. Cerca de 5-10% dos casos de câncer diagnosticados pertencem a esta categoria (NAGY; SWEET; ENG, 2004; RAHNER; STEINKE, 2008). A hipótese de suscetibilidade a um câncer com característica herdada se dá a partir de algumas observações: várias gerações afetadas; idades de diagnóstico precoce em relação a esperada para esse tipo de câncer na população em geral; dois ou mais familiares com o mesmo tipo de câncer do mesmo lado da família; indivíduos com múltiplos cânceres primários; ocorrência de condições não-malignas e câncer no mesmo indivíduo; ocorrência de cânceres conhecidos por serem geneticamente relacionados. Contudo, muitas famílias podem não exibir todos estes pontos devido à variabilidade

fenotípica e à existência de penetrância relacionada a idade que influenciam no risco de desenvolvimento de câncer (NAGY; SWEET; ENG, 2004).

A maioria das síndromes de câncer hereditário apresenta herança autossômica dominante onde os parentes de primeiro grau do probando - irmãos e filhos - possuem um risco de 50% de serem portadores da mutação que está segregando na família. Os riscos de câncer em portadores da mutação variam dependendo da síndrome, da mutação, e, às vezes, do gênero. Contudo, podem se aproximar de 85-100% ao longo da vida destes indivíduos (NAGY; SWEET; ENG, 2004; TREPANIER *et al.*, 2004; RAHNER; STEINKE, 2008). Neste caso há uma predisposição para o desenvolvimento de um ou alguns tipos específicos de câncer como resultado de uma mutação hereditária em genes relacionados ao reparo de danos no DNA e/ou no controle do ciclo celular. Mutações esporádicas nestes mesmos genes levam aos casos esporádicos de câncer nos mesmos tecidos e órgãos (RAHNER; STEINKE, 2008).

Cada síndrome de câncer hereditário exhibe determinadas características dentro de um espectro de tumores e estão relacionadas com alterações em determinados genes (GARBER; OFFIT, 2005; FOSTIRA *et al.*, 2007; RAHNER, STEINKE, 2008). Estas síndromes são caracterizadas principalmente pelo risco aumentado que apresentam para o desenvolvimento de tumores malignos, no entanto podem predispor recorrentemente a tumores benignos e também neoplasias endócrinas (NAGY; SWEET; ENG, 2004).

As síndromes de câncer hereditárias podem apresentar dois modos de herança autossômica: dominante ou recessiva. O primeiro modo de herança engloba, por exemplo, as seguintes síndromes: Síndrome de Câncer de Mama e Ovário Hereditária (HBOC) devido a mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* com casos de câncer de mama, ovário e próstata (FOSTIRA *et al.*, 2007; FOULKES, 2008; DALY *et al.*, 2010); Câncer de Cólon Não-Polipomatoso Hereditário (HNPCC) devido a mutações, especialmente, nos genes *MLH1*, *MSH2* e *MSH6* com casos principalmente de câncer de cólon, gástrico, pâncreas, via biliar, intestino delgado e endométrio (PAPADOPOULOS *et al.*, 1994; MECKLIN; JÄRVINEN, 2005); Polipose Adenomatosa Familiar (FAP) devido a mutações no gene *APC* com casos de câncer de cólon, tumores desmóides, hepatoblastoma, câncer de tireóide entre outros (KINZLER *et al.*, 1991; FOSTIRA *et al.*, 2007); a Síndrome de Li-Fraumeni (SLF) devido a

mutações principalmente no gene *TP53* com casos de sarcoma, câncer de mama, cérebro e adrenocortical (LI; FRAUMENI, 1969; BIRCH *et al.*, 1994); Retinoblastoma hereditário (*RB1*), com casos de retinoblastoma bilateral em crianças e outros tumores secundários; e a Neurofibromatose do Tipo 1 (NF1) com casos de neurofibroma, glioma no nervo óptico e neurofibrosarcoma (NAGY; SWEET; ENG, 2004; GARBER; OFFIT, 2005).

Ataxia-telangiectasia (*ATM*) com casos de linfoma não-Hodgkin e leucemia; Anemia de Fanconi (*FANC A-H*) com casos de neoplasias hematológicas; entre outros apresentam uma herança autossômica recessiva (NAGY; SWEET; ENG, 2004; RAHNER; STEINKE, 2008; FOSTIRA *et al.*, 2007).

Os cânceres hereditários tendem a se desenvolver em idade precoce, antes do momento em que a triagem ocorre na população em geral. Para a maioria das síndromes, não existe um plano de rastreio e por isso muitas vezes são detectadas em estágios avançados. Portanto, a identificação destes indivíduos mostra-se importante para a identificação de famílias portadoras de síndromes hereditárias, sua avaliação e escolha de estratégias futuras.

Além disso, a identificação da mutação causadora de câncer em um paciente, oferece a seus parentes a possibilidade de análise para verificar a presença ou ausência da mutação, identificando aqueles que herdaram a mutação e, portanto, possuem aumento de risco de desenvolvimento de câncer (GARBER; OFFIT, 2005; RAHNER; STEINKE, 2008).

Desta forma, a avaliação do risco genético de desenvolvimento de câncer envolve a análise da história familiar por meio da elaboração de heredogramas e avaliação de riscos através de modelos disponíveis na literatura para determinar se há sugestões de história esporádica, familiar ou hereditária. Por exemplo, no câncer de mama e ovário, diversos modelos são utilizados e auxiliam no cálculo da probabilidade de o indivíduo ser portador de mutação nos genes *BRCA1* e/ou *BRCA2*. Baseados na história familiar e na probabilidade de mutação nestes genes alvos são realizados os cálculos de risco de desenvolvimento do câncer a cada cinco anos. Os mais utilizados são: BRCAPRO (BERRY *et al.*, 1997; PARMIGIANI, BERRY, AGUILAR, 1998; BERRY *et al.*, 2002), Manchester (EVANS *et al.*, 2004), Penn II (PANCHAL *et al.*, 2008), Myriad (FRANK *et al.*, 2002), FHAT (GILPIN; CARSON; HUNTER, 2000), IBIS (TYRER; DUFF; CUZICK, 2004) e BOADICEA (ANTONIOU *et al.*,



2002; ANTONIOU *et al.*, 2004). Há modelos de cálculo de risco para outros tipos de câncer como o MelaPRO (WANG *et al.*, 2010) que estima a probabilidade de o indivíduo ser portador de mutação em *CDKN2A* nos casos de melanoma, e MMRpro e MMRpredict utilizados na investigação de mutações em *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* nos casos de HNPCC (Síndrome de Lynch) (CHEN *et al.*, 2007; POUCHET *et al.*, 2009; MERCADO *et al.*, 2012).

### 2.3 ACONSELHAMENTO GENÉTICO

A genética humana no Brasil teve seu início no final da década de 50 quando Crodowaldo Pavan, na época presidente da recente Sociedade Brasileira de Genética, criou uma comissão com o objetivo de organizar a pesquisa na área de genética humana no país. Esta foi composta pelos pesquisadores doutores Francisco Mauro Salzano, Pedro H. Saldanha e Newton Freire-Maia conjuntamente com Oswaldo Frota-Pessoa que já vinha atuando nesta área (PERONDINI, 2010).

Oswaldo Frota-Pessoa (1917-2010) e Newton Freire-Maia (1918-2003) foram os pioneiros do aconselhamento genético no país, cujo objetivo inicial era proporcionar esclarecimento às pessoas com história familiar de doenças hereditárias e outras características genéticas. Frota-Pessoa, em 1958 na Universidade de São Paulo (USP), criou o primeiro serviço de aconselhamento genético do país. E, no mesmo ano, Freire-Maia transformou o então Laboratório de Genética da Universidade Federal do Paraná no Laboratório de Genética Humana, que posteriormente deu origem ao Departamento de Genética desta universidade, passando também a atuar na área de aconselhamento genético além da pesquisa sobre casamentos consanguíneos e malformações dos membros (SILVEIRA, 2006).

O conceito de informação se refere ao ato de transmitir, de maneira impessoal e distante, por exemplo, teorias, dados, classificações e riscos. O aconselhamento, por sua vez, se refere à ação diante de questionamentos, por exemplo, na área de genética médica com relação à causa de uma doença em uma família, como esta irá se desenvolver, quais os riscos (probabilidades) que filhos e/ou parentes têm em desenvolver a doença, quanto à possibilidade de

realização de exames e tratamentos. Assim, o aconselhador deverá orientar, corrigir e auxiliar na compreensão destas questões (FREIRE-MAIA, 1976). No entanto, estes conceitos (informação *versus* aconselhamento) mostram-se extremamente relacionados uma vez que todo aconselhamento apresenta elementos informativos que muitas vezes são solicitados pelo próprio paciente com o objetivo de melhorar sua compreensão com relação à determinada condição genética presente em sua família. Em outras situações, o paciente pode buscar informação sobre alguma condição que possui ou que sua família apresenta, mas com desejo de encontrar ajuda, uma direção, um aconselhamento (FREIRE-MAIA, 1976).

Segundo o *American Society of Human Genetics* o aconselhamento genético (AG) é definido como um processo de comunicação que lida com doenças genéticas em uma família levando em consideração análises de risco de ocorrência. A partir disto, profissionais capacitados devem informar ao paciente e seus parentes, auxiliá-los na compreensão do diagnóstico, do risco de recorrência, do desenvolvimento da doença, assim como discutir os meios de prevenção. Mostra-se importante, neste momento, expor ao paciente a possibilidade de recorrência da doença para parentes, como filhos e irmãos, além de informações relacionadas à reprodução, o que pode incluir o diagnóstico pré-natal. Deste modo, deve-se estabelecer um meio de comunicação entre paciente e os profissionais da saúde (GRIMM; ZERRES, 2010; SILVA *et al.*, 2013; SCHMIDTKE *et al.*, 2015).

A consulta de AG leva em consideração o modo de herança e/ou diagnóstico, a análise do heredograma de ao menos três gerações e os resultados de testes moleculares e/ou dados clínicos de investigação padrão (HANNUM, 2011; SILVA *et al.*, 2013). Ao realizar um aconselhamento genético, é importante que os resultados e informações dos indivíduos e/ou da família sejam revelados apenas ao paciente, assim como devem ser respeitadas suas decisões, levando-se em consideração a sua formação, religião, padrões étnicos e questões éticas, sem interferir ativamente nas suas escolhas (GRIMM; ZERRES, 2010; SCHMIDTKE *et al.*, 2015). O exercício do AG consiste em uma entrevista onde o paciente responde questões que englobam principalmente sua história familiar, gestacional e neonatal no que diz respeito à ocorrência de doenças, idades de diagnóstico e falecimentos, aspectos de seu estilo de vida,

entre outros. A consulta irá resultar, após a realização de exames complementares que podem ser solicitados, em diagnóstico e/ou prognóstico clínico e reprodutivo do indivíduo e sua família frente à doença analisada.

O aconselhamento genético pode ser dividido em prospectivo e retrospectivo. O primeiro tem por objetivo a prevenção de certa doença em gerações futuras de uma família, orientando-a sobre fatores de risco que podem aumentar a probabilidade da criança ser afetada, tais como: a existência de casamentos consanguíneos, idade materna avançada e exposição a agentes teratogênicos. O AG retrospectivo, por sua vez, é realizado quando já há algum caso na família e tem como objetivo oferecer suporte à família assim como ao paciente com relação à doença, às medidas que podem ser tomadas assim como cuidados necessários (SILVA *et al.*, 2013).

De um modo geral, a indicação para uma consulta de aconselhamento genético é oferecida quando o médico e/ou o indivíduo consideram-na como um meio para ajudar a compreender uma condição ou uma suspeita que possa estar relacionada com um risco genético. As indicações para o aconselhamento genético encontram-se listadas no quadro 3.

#### QUADRO 3 - INDICAÇÕES PARA CONSULTA DE ACONSELHAMENTO GENÉTICO

1. Nascimento de criança com doença congênita, malformações, retardo de desenvolvimento neuropsicomotor;
2. Um ou mais parentes que apresentem alguma doença genética ou deficiência suspeita;
3. Indivíduo já afetado;
4. Casal consanguíneo;
5. Histórico de infertilidade e/ou de abortos recorrentes;
6. Influências mutagênicas (idade materna avançada, exposição pré/pós-concepção a mutágenos);
7. Exposição a agentes teratogênicos (radiação, drogas e álcool).
8. Infecções pré/pós concepção
9. Conhecimento prévio de anormalidade cromossômica na família;
10. Recorrência de casos de câncer na família;
11. Pacientes em busca de diagnóstico específico para um problema real não diagnosticado anteriormente.

FONTE: Adaptado de SCHMIDTKE *et al.* (2015)

Atualmente existe um debate sobre o que se considera por “aconselhamento genômico”, o que será incluído e quem irá praticá-lo. Esta modalidade de aconselhamento surgiu conjuntamente aos avanços das tecnologias moleculares que vêm demonstrando causas múltiplas para diversas doenças hereditárias exigindo uma abordagem mais completa e o uso da chamada “medicina genômica”. Deste modo, envolve cada vez mais informações sobre as condições genéticas hereditárias avançando assim para o aconselhamento genômico. A partir disso, espera-se aumento do número de condições incluídas em testes; aumento do número de resultados divulgados já que mais testes podem ser indicados; capacitação dos profissionais envolvidos para a interpretação dos resultados assim como de suas possíveis relações (ORMOND, 2013).

Para que o aconselhamento genético cumpra seu objetivo é necessário que seja praticado por uma equipe multidisciplinar, composta além de geneticistas e médicos especialistas em diversas áreas, uma equipe psicossocial para que exista auxílio aos pacientes e suas famílias visando um melhor esclarecimento sobre a situação assim como apoio nos momentos necessários (BRUNONI, 2002).

Hoje o aconselhamento genético abrange diversas áreas da saúde entre elas a reprodução biológica, riscos e probabilidades de nascimento de crianças com alguma condição genética e cuidados relativos a doenças genéticas de expressão tardia, como a doença de Huntington por exemplo, além de casos de cânceres hereditários como, por exemplo, as Síndromes de Câncer de Mama e Ovário Hereditários e de Câncer de Cólon Não-Polipomatoso Hereditário (GUEDES; DINIZ, 2009).

Famílias que exibem casos de câncer quando encaminhadas ao aconselhamento genético são informadas da possibilidade destes serem hereditários. Neste caso, o exercício do AG contribuí, principalmente, com o diagnóstico precoce em indivíduos da família possibilitando início de tratamento uma vez que neste caso há um maior risco para o desenvolvimento de câncer na família. Deste modo é possível evitar o desenvolvimento de tumores mais agressivos caso a detecção ocorresse mais tarde. Portanto, a realização de cálculos de ocorrência para membros da família, direcionamento para tratamentos e sugestão de medidas preventivas torna o aconselhamento

genético uma importante ferramenta para o diagnóstico precoce e redução das taxas de mortalidade entre pacientes com câncer hereditário por meio de medidas de rastreamento, prevenção e de redução de risco (DANTAS *et al.*, 2009; RILEY *et al.*, 2012)

### 3. JUSTIFICATIVA

Os Menonitas compõem um grupo religioso que devido às perseguições passaram a viver em comunidades fechadas levando a um aumento do número de casamentos consanguíneos e conseqüente geração de descendentes homozigotos. Assim, nesta comunidade é observada agregação de determinadas doenças hereditárias, o que torna os Menonitas um grupo populacional interessante para estudos genéticos (JAWORSKI *et al.*, 1988; ARCOS-BURGOS; MUENKE, 2002).

Neste contexto, este trabalho se propôs a estudar famílias residentes na comunidade Menonita da Colônia de Witmarsum no Paraná, realizando o levantamento de casos de câncer para determinar se existem evidências de caráter hereditário. Além da relevância científica, o aspecto social também é parte do projeto, através dos aspectos educacionais do aconselhamento genético, visando esclarecer a população e auxiliar na compreensão da história familiar, além de orientar na tomada de medidas para redução dos riscos de câncer.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste estudo consiste em um levantamento de casos de câncer em famílias da comunidade Menonita de Witmarsum (PR), definir se há ou não evidências de padrão hereditário e efeito fundador, além de auxiliar no aspecto educacional através do aconselhamento genético.

### 4.2 Objetivos específicos

- Coleta de dados através de entrevistas com ao menos um indivíduo por família voluntária;
- Montagem e análise de heredogramas (cálculos de riscos);
- Seleção das famílias sugestivas de câncer com padrão hereditário;
- Análises moleculares em membros selecionados destas famílias;
- Elaboração de laudos com os respectivos cálculos de riscos para todas as famílias.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná (CAAE 54901715.7.0000.0102).

As etapas de desenvolvimento do estudo estão representadas no fluxograma abaixo (FIGURA 4) e serão apresentadas individualmente em sequência.

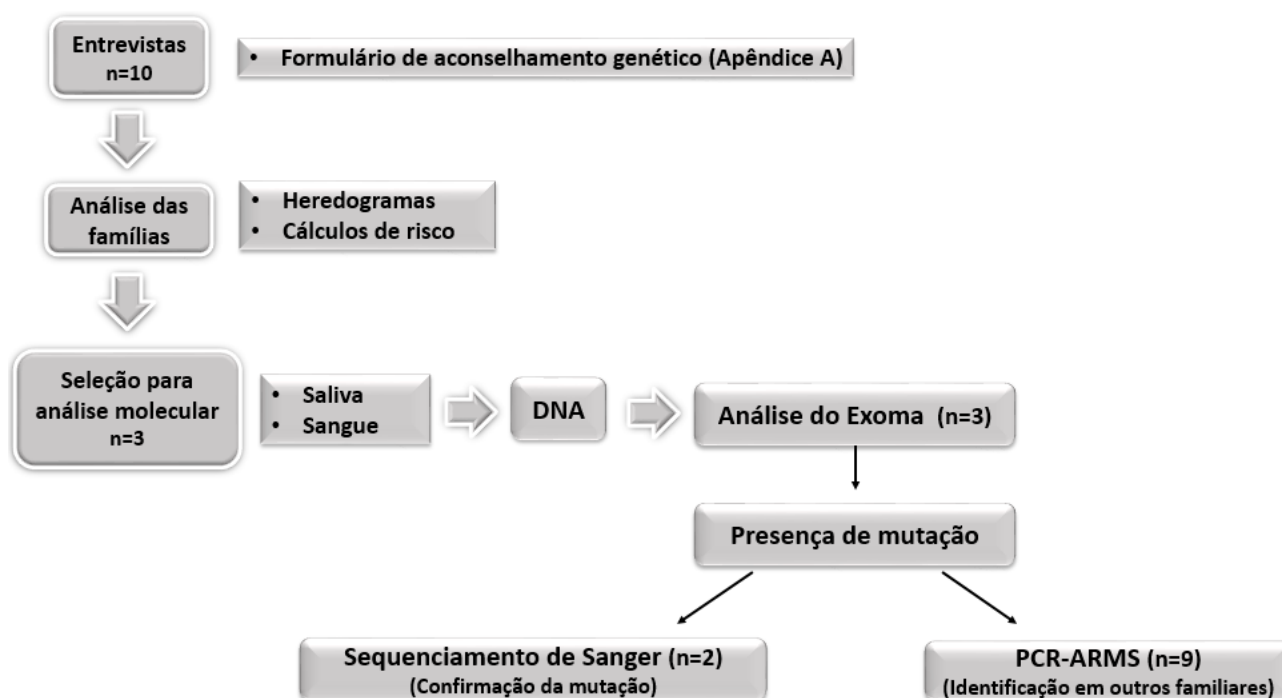


FIGURA 4 - FLUXOGRAMA DAS ETAPAS DESENVOLVIDAS NO PRESENTE ESTUDO.

FONTE: A autora, 2016.

### 5.1 ENTREVISTA E ANÁLISE DAS FAMÍLIAS

A primeira etapa da pesquisa consistiu na realização de entrevista com as famílias interessadas em participar do estudo. Dez famílias se apresentaram de forma voluntária e foram visitadas em suas residências. Neste encontro procurou-se saber mais sobre a história de câncer e outras doenças dentro da família, verificou-se, quando possível, exames e laudos, e foi preenchida uma ficha elaborada para o aconselhamento genético (APÊNDICE A). As informações obtidas foram analisadas através do programa *CancerGene*, da U.



*T. Southwestern Medical Center at Dallas* versão 5.1 (2010). Este *software* permite a construção do heredograma e concentra as análises realizadas individualmente por vários outros, utilizando vários algoritmos para estimar a probabilidade de um indivíduo ser portador de mutação em genes de predisposição para alguns tipos de câncer, como *BRCA1* e *BRCA2* – câncer de mama e ovário; *MLH1*, *MSH2* e *MSH6* – câncer colorretal e de endométrio (HNPCC ou Síndrome de Lynch); e *CDKN2A* ou *p16* – melanoma familiar. A partir da inserção de dados da história familiar, o programa faz uso de uma variedade de modelos matemáticos, principalmente, o BayesMendel BRCAPRO, MMRpro e MelaPro para os cálculos de probabilidade de desenvolvimento destes tipos de câncer a cada cinco anos ao longo da vida do indivíduo (FIGURA 4). Os heredogramas foram refeitos através do PROGENY®, um programa online gratuito ([www.progenygenetics.com/online-pedigree/](http://www.progenygenetics.com/online-pedigree/)) com o objetivo de torna-lo mais completo e de melhor visualização.

Com os resultados obtidos a partir deste programa, foi realizado um retorno inicial às famílias Menonitas da Colônia de Witmarsum em relação aos riscos que possuem para o desenvolvimento destes tipos de câncer, sendo esta a segunda etapa do aconselhamento genético realizado. Um laudo explicitando os riscos e se havia evidências de câncer hereditário ou não foi entregue a cada probando (APÊNDICE B).

QUADRO 4 - EXEMPLO DE RESULTADO GERADO PELA ANÁLISE REALIZADA PELO PROGRAMA *CANCERGENE*

Mutation Probabilities			
<b>BRCA1</b>		<b>MLH1</b>	
Couch	0,050	MMRpro	0,000
Shattuck-Eidens	0,026	MSH2	
BRCAPRO	0,232	MMRpro	0,000
<b>BRCA2</b>		<b>MSH6</b>	
BRCAPRO	0,184	MMRpro	0,000
<b>Any BRCA</b>		<b>MLH1 or MSH2</b>	
Myriad	0,080	MMRpro (+MSH6)	0,000
NCI CART	No Calc	Weijnen	0,000
BRCAPRO	0,416	Myriad	No Calc
p16	0,000	Pancreas Gene:	-0,727
Cancer Risks		5-Year	Lifetime
<b>Breast</b>			
Gail			
Claus	0,000	0,000	
BRCAPRO	0,025	0,045	
Ovarian	0,053	0,094	
Colorectal	0,009	0,016	
Endometrial	0,003	0,005	
Pancreas	-0,037	-0,052	
Melanoma	0,003	0,005	

FONTE: *Software Cancergene* (2010).

## 5.2 SELEÇÃO PARA ANÁLISES MOLECULARES

Após a realização da primeira etapa do estudo (análise dos heredogramas), das dez famílias participantes três foram selecionadas para a investigação de possíveis condições genéticas, sendo que uma delas declinou da possibilidade de investigação molecular. Entre as duas famílias restantes, elaboramos a hipótese de “Síndrome de Câncer de Mama e Ovário Hereditários (HBOC)” e de “Neurofibromatose do tipo 1” na outra.

As famílias serão descritas e caracterizadas individualmente na seção de Resultados.

### 5.3 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Amostras de sangue periférico e/ou saliva de oito indivíduos das famílias selecionadas foram coletadas mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pelos participantes do estudo (APÊNDICE C).

As amostras de sangue coletadas em tubos contendo EDTA, foram processadas de acordo com protocolo já estabelecido no Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética (LabCHO) do Departamento de Genética, da UFPR. Este consiste em verter o conteúdo de sangue em tubo do tipo Falcon de 14ml, completar com solução RCLB (solução tampão para lise de células vermelhas) até 12ml e centrifugar a 784g por 5 minutos 3 a 4 vezes até observar-se o botão de leucócitos, que posteriormente é ressuspensão em solução PBS, novamente centrifugado e posteriormente armazenado em freezer -80°C. As amostras de saliva foram coletadas através do kit de coleta de saliva ORAcollect-DNA (ORC-100) da Genotek e encaminhadas para extração de DNA no Laboratório Mantis em Curitiba (PR).

### 5.4 EXTRAÇÃO DE DNA

#### 5.4.1 Extração de DNA de sangue periférico

O método *Salting Out* foi utilizado para a obtenção de DNA das amostras de sangue dos indivíduos selecionados seguindo o protocolo já estabelecido no LabCHO, modificado de Miller e colaboradores (1988).

Resumidamente o procedimento consiste na lise dos leucócitos por meio de Proteinase K (10 mg/ml) e SDS 20%, desproteinização pela ação de solução saturada de NaCl (5M) e precipitação do DNA através da utilização de Etanol absoluto. Ao final, o DNA foi ressuspensionado em cerca de 40µl de água ultrapura e armazenado a -20°C.

#### 5.4.2 Extração de DNA de saliva

O DNA genômico de amostras de saliva foi extraído no Laboratório Mantis pelo método com *PrepIT-L2P* (Oragene). Este método consiste na extração a partir da precipitação do DNA com etanol seguida de processo de purificação com o reagente prepIT-L2P.

O procedimento consiste, resumidamente, na utilização de 500µl de saliva que após serem incubados a 50°C por, no mínimo, uma hora, acrescenta-se o reagente PT-L2P sendo posteriormente incubado em gelo. Após este período, adiciona-se etanol 95-100%. Em seguida a amostra fica em temperatura ambiente por 10 minutos para permitir a completa precipitação do DNA. Posteriormente, realiza-se a retirada de impurezas através de centrifugação, adicionando-se etanol 70% deixando o tubo em repouso em temperatura ambiente. Após a retirada do etanol adiciona-se tampão AE para que o DNA precipitado seja ressuspendido.

#### 5.5 ANÁLISE DO EXOMA POR SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO (NSG)

Há menos de uma década o sequenciamento total de exoma vem sendo empregado na pesquisa clínica contribuindo para a descoberta de genes relacionados a diversas condições genéticas. Por exemplo, em doenças mendelianas recessivas (BILGÜVAR *et al.*, 2010) e dominantes (WU *et al.*, 2012), aquelas sem padrão de herança definido (O'ROAK *et al.*, 2012; SANDERS *et al.*, 2012) e doenças complexas comuns.

Genes codificadores de proteínas compõem cerca de 1% do genoma humano, contudo cerca de 85% das mutações relacionadas a doenças genéticas estão localizadas nas regiões codificantes do genoma, ou seja, nos éxons. Diante disto, o sequenciamento total de exoma é uma técnica que visa selecionar e sequenciar as regiões codificadoras de todos os genes e, conjuntamente com plataformas de sequenciamentos de nova geração, possibilita a análise de regiões funcionais do genoma humano com grande eficiência. Deste modo, esta técnica mostra-se uma boa ferramenta para a pesquisa de causas genéticas de diversas doenças auxiliando os pesquisadores na busca por variantes na

sequência de DNA em indivíduos afetados. Atualmente, pode-se alcançar aproximadamente 98% de sensibilidade e 99,8% de especificidade a partir dos dados de sequenciamento de exoma (GOH; CHOI, 2011; MAJEWSKI *et al.*, 2011; YANG *et al.*, 2013; YANG *et al.*, 2014).

O sequenciamento de exoma é realizado, geralmente, da mesma maneira independente da plataforma de sequenciamento de nova geração utilizada. Esta técnica pode ser basicamente dividida em duas etapas: inicialmente é preparada uma biblioteca de DNA genômico e a hibridização dos fragmentos para captura é realizada, a segunda parte envolve utilização do sequenciamento de nova geração dos fragmentos alvos eluidos. Uma vez que as leituras do sequenciamento forem geradas, as sequências são comparadas com as do genoma humano de referência e, assim, as variantes podem ser observadas. Em sequência, avalia-se seu potencial efeito biológico por meio de *softwares* e bases de dados disponíveis publicamente.

No entanto, como toda técnica, esta possui algumas limitações. Por exemplo, não abrange todas as regiões codificantes devido à caracterização incompleta do genoma humano, não abrange elementos não-codificantes potencialmente funcionais, incluindo regiões não traduzidas, *enhancers* e RNAs longos não codificantes, ainda apresenta limitações para a identificação de variações estruturais, como inversões, translocações e variações de número de cópias. Ainda assim, vem sendo utilizada por suas vantagens práticas que permitem uma análise robusta conjunta de diversos pacientes, ponto importante na descoberta de mutações dentro da pesquisa em genética clínica (GOH; CHOI, 2011).

Com o objetivo de investigar variantes em genes relacionados com o desenvolvimento da “Síndrome de Câncer de Mama e Ovário Hereditários (HBOC)” e da “Neurofibromatose do tipo 1” foi realizada a análise de exoma de três indivíduos previamente selecionados em parceria com o Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe em Curitiba (PR) através da plataforma *Ion Torrent™* (*ThermoFisher Scientific*) e analisado pelo *software Integrative Genomics Viewer (Broad Institute)*

A preparação da biblioteca de exoma foi realizada com o *kit Ion Ampliseq™ Exome RDY Library (ThermoFisher Scientific)* e o enriquecimento dos éxons através da tecnologia *Ampliseq*. O corte dos RNA iniciadores

(*primers*), ligação dos adaptadores e purificação por *beads* magnéticas foram realizadas com utilização do reagente AMPure XP. A preparação do *template* foi realizada pelo kit *Ion PI Hi-Q OT2 200* (ThermoFisher Scientific). A PCR em emulsão foi realizada no equipamento *OneTouch™ 2* (ThermoFisher Scientific) e purificação (biotina-avidina) por *beads* magnéticas ligadas à estreptavidina com utilização do *Dynabeads® MyOne™ Streptavidin C1* (ThermoFisher Scientific).

O sequenciamento foi feito no equipamento *Ion Proton™* (ThermoFisher Scientific) utilizando-se o kit *Ion PI™ Hi-Q™ Sequencing200* (ThermoFisher Scientific). No mapeamento do genoma (versão hg19) foi usado o *software* TMAP no computador acoplado ao equipamento e as variantes observadas através do *software* *IonReporter™* (ThermoFisher Scientific).

## 5.6 IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÃO ESPECÍFICA POR PCR-ARMS

O sistema ARMS, do inglês *Amplification Refractory Mutation System*, é uma estratégia de amplificação por PCR em que o *primer* é capaz de discriminar sequências que diferem em apenas um nucleotídeo, sendo utilizada para a identificação de alelos específicos e detecção de mutações pontuais associadas às doenças (NEWTON *et al.*, 1989; BOTTEMA *et al.*, 1993). A PCR-ARMS é uma técnica rápida, confiável e que possui um procedimento simples, são utilizados três tipos de *primers* para a definição dos genótipos: o “*primer* comum” de controle, o “*primer* normal” que é complementar à sequência selvagem do DNA e “*primer* mutado” que é complementar à sequência mutada no DNA. Após a realização da amplificação da amostra, os produtos da PCR são observados em gel de agarose e o diagnóstico realizado a partir da análise do tamanho dos *amplicons*.

Após a identificação de uma mutação específica no gene *NF1* em dois indivíduos de uma mesma família pela análise do exoma, esta técnica foi utilizada para a identificação dos genótipos de nove integrantes. Os *primers* foram escolhidos a partir da análise de aproximadamente 1500pb ao redor da mutação c.3601delT de *NF1* (chr17:29,558,515 + 1500). A primeira análise foi realizada através do *software* *RepeatMasker* e BLAST, para verificar repetições e presença de pseudogenes. Assim, a partir do programa *PrimerSelect*

(DNAS<sup>Star</sup>), foram escolhidos dois *primers* externos (controle) e dois internos (*forward* e *reverse*) seletivos para os alelos selvagem e mutado, respectivamente. As sequências e temperaturas de anelamento (TA) referentes aos quatro *primers* são apresentadas na Tabela 1.

TABELA 1 - DESCRIÇÃO DOS PRIMERS UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE PCR-ARMS

	<b>Sequência</b>	<b>TA(°C)</b>
<i>Primer</i> controle (F1)	TACATGGTTCTGATTTAAGGTAGC	57,6°
<i>Primer</i> controle (R1)	CAGGGTGGCATATTATGAAGTG	58,4°
<i>Primer</i> normal (Fwt)	AGAGATTTGGACCAGGCAAGTAT	58,9°
<i>Primer</i> mutado (Rmut)	CTAGAAGTGAACTACTGCTTACT	57,6°

FONTE: A autora (2016).

Para as reações de amplificação dos fragmentos de interesse do gene *NF1* foram realizadas duas reações por amostra para identificação do alelo selvagem utilizando-se os *primers* F1, R1 e Fwt, e do alelo com a variante utilizando-se os *primers* F1, R1 e Rmut (Tabela 1). Ambas as reações utilizaram 50ng de DNA genômico das amostras com os seguintes reagentes: 2 µl de *Buffer* (10x), 1,6 µl de dNTPs (2.5 mM), 0,6 µl de cada um dos *primers* (20 uM), 1 µl de Taq Polimerase e 12,6 µl de água ultra-pura para um volume final de 20 µl. As condições de ciclagem da reação de PCR-ARMS estão descritas na Tabela 2. O produto amplificado nessa PCR foi visualizado por meio de eletroforese, em gel de agarose 1,5%, TBE 0,5x, com coloração em brometo de etídeo.

TABELA 2 - CONDIÇÕES DE CICLAGEM DA REAÇÃO DE PCR-ARMS

	<b>Ciclo</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>
Pré-desnaturação	<b>1</b>	94°C	5'
Desnaturação	<b>35</b>	94°C	30''
Hibridização		60°C	20''
Extensão		72°C	45''
Extensão	<b>1</b>	72°C	5'
<i>Hold</i>	<b>1</b>	10°C	∞

FONTE: A autora (2016).

## 5.7 SEQUENCIAMENTO DE SANGER

Os princípios do processo de replicação do DNA foram usados por Sanger e colaboradores (1975) no desenvolvimento do processo, agora conhecido como, Sequenciamento “dideoxi” de Sanger ou “método de Sanger”. Este processo utiliza a capacidade da DNA-polimerase em incorporar 2', 3'-dideoxynucleótidos, análogos de bases de nucleotídeos que não possuem o grupo 3'-hidroxil essencial para a formação da ligação fosfodiéster.

O sequenciamento pelo método de Sanger requer um molde de DNA, um *primer*, a DNA polimerase, nucleotídeos (dNTPs), didesoxinucleotídeos (ddNTPs) e tampão de reação (“*buffer*”). Quatro reações distintas são criadas, cada uma contendo nucleotídeos marcados e que são ddA, ddC, ddG ou ddT. A DNA polimerase adiciona um desoxinucleotídeo ou um correspondente 2', 3'-didesoxinucleotídeo em cada passo de extensão da cadeia de DNA. Qual das moléculas irá ser adicionada vai depender da concentração relativa delas na reação. Quando um desoxinucleotídeo (A, C, G ou T) é adicionado à extremidade 3', a extensão da cadeia pode continuar, enquanto que se um didesoxinucleotídeo é adicionado à extremidade 3', a extensão da cadeia é interrompida. Assim, este tipo de sequenciamento resulta na formação de produtos de diversos comprimentos terminados com didesoxinucleotídeos na extremidade 3'. Os produtos da etapa de extensão são então separados por eletroforese em que um campo elétrico é aplicado de modo que os fragmentos de DNA carregados negativamente se movem em direção ao eletrodo positivo. A velocidade com que



o fragmento se move através do meio é inversamente proporcional ao seu peso molecular levando à separação dos fragmentos por tamanho.

Esta técnica foi realizada em dois indivíduos para a confirmação da mutação encontrada no gene *NF1* em parceria com o Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade (LIGH) do departamento de Genética da UFPR. Os *primers* utilizados para realização desta técnica foram os externos (F<sub>1</sub> e R<sub>1</sub>) usados na PCR-ARMS com o objetivo que amplificar a região onde a mutação de estudo se encontra. Para isso, os kits *BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems)* e *BigDye® XTerminator™ Purification (Applied Biosystems)* foram utilizados de acordo com especificações do fabricante. A eletroforese capilar foi realizada no sequenciador ABI3130 (*Applied Biosystems*), seguindo as recomendações do fabricante. A análise dos resultados foi feita por meio do *software online BioEdit® (Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, 1997-2013)* (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>).

## 5.8 ANÁLISE DA PROTEÍNA NEUROFIBROMINA

A análise da proteína Neurofibromina foi realizada a partir da sequência NM\_001042492.2 do transcrito da variante 1 disponível *online* pelo *National Center for Biotechnology Information (NCBI- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)* sendo que a proteína (NF1-001, ENST00000358273.8 do Ensembl, P21359 no Uniprot) possui 2839 aminoácidos. Em seguida, esta sequência foi reduzida para a sequência codificante CDS, ou seja, a porção anterior ao códon inicial ATG e posterior ao códon de parada TGA foram retiradas, mantendo-se apenas a sequência referente à proteína. A partir de uma cópia desta sequência foi elaborada a sequência com a mutação de estudo (deleção de uma timina na posição 3601 da sequência NM\_001042492.2 que corresponde à posição 3218 da sequência CDS), uma vez que não havia disponível em bancos de dados.

O alinhamento das duas sequências foi realizado no *software GeneDoc* ([www.genedoc.software.informer.com/2.7/](http://www.genedoc.software.informer.com/2.7/)). Posteriormente as sequências nucleotídicas foram traduzidas para aminoácidos no programa ApE (<http://biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/>) e então utilizadas para a realização da modelagem nas ferramentas online *SWISS-MODEL ExPASy* da

*Swiss Institute of Bioinformatics Biozentrum da University of Basel da Suíça* ([www.swissmodel.expasy.org](http://www.swissmodel.expasy.org)) e *PHYRE 2 (Protein Homology/analogY Recognition Engine)* do *Structural Bioinformatics Group da Imperial College London* (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>). Ambos são utilizados para a realização de modelagem da estrutura 3D de proteínas a partir de sequência de aminoácidos empregando técnicas de modelação por homologia através da busca em bibliotecas de sequências de proteínas conhecidas auxiliando na análise da função e estrutura de proteínas. O *SWISS-MODEL Expasy* compara a sequência em estudo com aqueles presentes na biblioteca do *SWISS MODEL (SMTL – Swiss Model Template Library)* e então a busca é realizada a partir do *Blast* e *HHblits* com o objetivo de identificar proteínas que são evolutivamente relacionadas com a de estudo. Se uma ou mais são identificadas, o alinhamento é utilizado para a construção de um modelo estrutural 3D da proteína. Em seguida, a qualidade do modelo é avaliada através dos valores de *GMQE (Global Quality Estimation Score)* e do *QMEAN* (ARNOLD *et al.*, 2006; BENKERT; BIASINI; SCHWEDE, 2011; BIASINI *et al.*, 2014). Já o *PHYRE2* realiza a comparação da sequência de estudo com um banco de dados de sequências de proteínas conhecidas através, apenas, do *HHblits*. Este alinhamento é utilizado para prever a estrutura secundária com o *PSIPRED* e ambos são convertidos em um modelo oculto de Markov (*HMM – Hidden Markov Model*) que é verificado em um banco de dados de *HMMs* de proteínas de estruturas conhecidas, assim aqueles alinhamentos que exibirem os maiores escores são utilizados para a construção dos modelos 3D (KELLEY *et al.*, 2015).

## 6. RESULTADOS

### 6.1 ANÁLISE GERAL DAS FAMÍLIAS MENONITAS

Ao analisar os heredogramas realizaram-se diagnósticos de tumores benignos e malignos de diversos tipos nestas famílias Menonitas, totalizando 18 tipos relatados afetando 59 indivíduos de nove famílias Menonitas (TABELA 3). Os tipos de tumores que se mostraram mais frequentes foram do sistema nervoso central (15,4%), câncer de mama (10,8%), de pele do tipo basocelular (9,2%) e de próstata (6,2%). Os números de casos apresentados correspondem às informações dadas pelos probandos, que em diversos momentos não sabiam informar o tipo de câncer com o qual um parente foi diagnosticado ou as informações não foram suficientes para confirmar o tipo (21,5%).

TABELA 3 - TIPOS DE TUMORES EM NOVE FAMÍLIAS MENONITAS ANALISADAS  
(\*) não havia informação suficiente para afirmar qual tipo de tumor.

<b>Tipo de tumor</b>	<b>Número de casos</b>	<b>Frequência Relativa (%)</b>
Sistema Nervoso Central	10	15,4
Mama	7	10,8
Pele Basocelular	5	9,2
Próstata	4	6,2
Leucemia	3	4,6
Melanoma	3	4,6
Fígado	3	4,6
Intestino	3	4,6
Gástrico	2	3,1
Sarcoma	2	3,1
Tireóide	2	3,1
Hemangioma	1	1,5
Carcinoma epidermóide	1	1,5
Esôfago	1	1,6
Bexiga	1	1,5
Pâncreas	1	1,5
Pulmão	1	1,5
Conduto auditivo	1	1,5
Sem informação*	14	21,5
<b>Total</b>	<b>65</b>	

FONTE: A autora, 2016.

Todas as famílias participantes receberam retorno onde tais resultados foram apresentados e um laudo final ou parcial foi entregue.

## 6.2 DESCRIÇÃO DAS FAMÍLIAS MENONITAS

Ao visitar as famílias Menonitas da Colônia de Witmarsum no Paraná, dez se mostraram dispostas a participar do estudo. No entanto, uma família foi retirada por não ser integrante dos Menonitas apresentando apenas origem alemã (família Wit08), totalizando assim nove famílias participantes. Inicialmente, os indivíduos foram entrevistados e o cálculo de risco para o desenvolvimento de alguns tipos de câncer como de mama, ovário, colorretal, endométrio e melanoma, assim como a probabilidade de mutação nos genes correspondentes foram realizados. Os dados referentes às probabilidades de desenvolvimento de câncer de pâncreas não foram considerados, por termos detectado muitas discrepâncias em relação aos históricos.

### 6.2.1 Família Menonita da Colônia de Witmarsum 1 (Wit01)

O probando é uma mulher de 55 anos, U.F.W. (III-6), que nasceu na cidade de Straubing na Alemanha (Bavária) e vive na Colônia de Witmarsum há 27 anos, tem três filhas de 26, 24 e 22 anos de idade. Identificamos seu caso pessoal de carcinoma de mama ductal invasor diagnosticado aos 45 anos de idade e com receptor de estrogênio positivo (RE+). A mãe faleceu aos 66 anos de acidente vascular cerebral (AVC) e não teve diagnóstico de câncer. O pai (II-1), com 85 anos, tem histórico de “câncer de intestino” diagnosticado aos 81 anos de idade e a avó paterna (I-2) faleceu aos 65 anos devido a um câncer que havia dúvidas entre ser de esôfago ou estômago diagnosticado aos 64 anos de idade. A partir destas e outras informações coletadas no instante da entrevista construiu-se o heredograma desta família representado na FIGURA 5. Além disso, foram realizados os cálculos de risco para o desenvolvimento de câncer de ovário, colorretal, endométrio e melanoma, (FIGURA 6 e TABELA 4) e as probabilidades de mutação nos principais genes relacionados a estes tipos de câncer. Posteriormente, com a finalidade de realizar os cálculos para suas filhas,

foram adicionados os casos de seu marido (III-7) e sogro (II-3) diagnosticados com câncer de pele do tipo basocelular e de sua sogra (II-4) diagnosticada com sarcoma, porém sem informação de idades de diagnóstico.

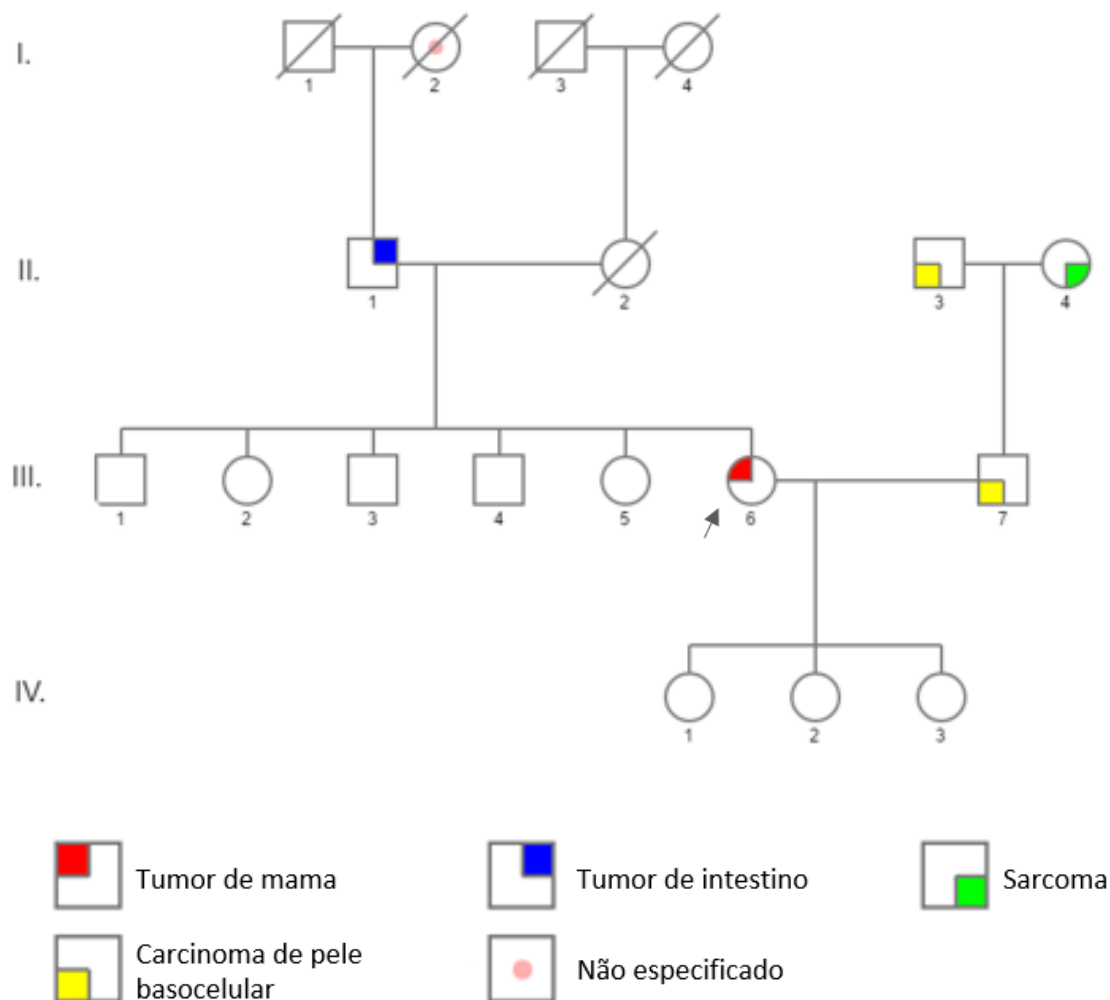


FIGURA 5 - HEREDOGRAMA DA FAMÍLIA WIT01. O probando é indicado com a flecha e os indivíduos afetados de acordo com a legenda.

FONTE: A autora, 2016 (<http://www.progenygenetics.com/>).

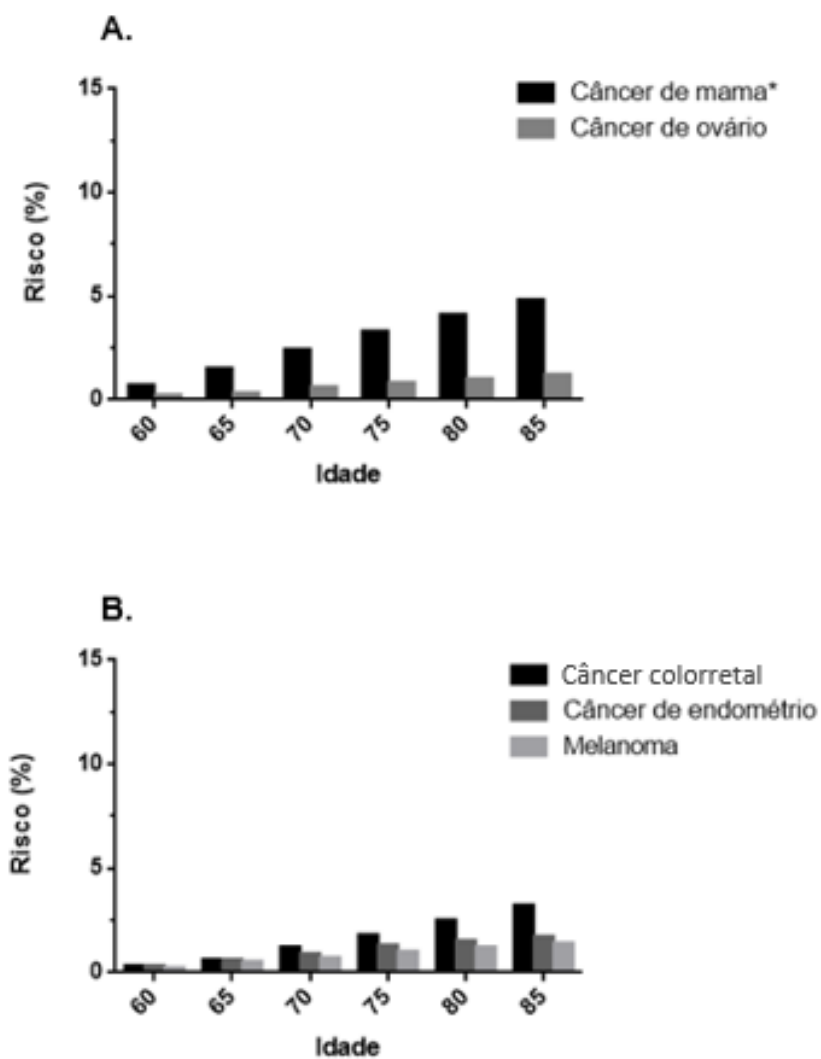


FIGURA 6 - GRÁFICOS DA PROBABILIDADE DO PROBANDO DA FAMÍLIA WIT01 DESENVOLVER ALGUNS TIPOS DE CÂNCER AO LONGO DA VIDA. **A.** Câncer de mama e ovário; **B.** Câncer colorretal, de endométrio e melanoma. (\*) Neste caso os valores correspondem ao risco de um câncer na mama contralateral.

FONTE: A autora, 2016 (Software GraphPad Prism 6).

TABELA 4 - PROBABILIDADE DE DESENVOLVIMENTO DE ALGUNS TIPOS DE CÂNCER AO LONGO DA VIDA PARA O PROBANDO DA FAMÍLIA WIT01

Idade	Câncer de mama*	Câncer de ovário	Câncer colorretal	Câncer de endométrio	Melanoma
60	0,007	0,002	0,003	0,003	0,002
65	0,015	0,003	0,006	0,006	0,005
70	0,024	0,006	0,012	0,009	0,007
75	0,033	0,008	0,018	0,013	0,010
80	0,041	0,010	0,025	0,015	0,012
85	0,048	0,012	0,032	0,017	0,014

(\*) Valores referentes a probabilidade de desenvolver câncer na mama contralateral.

FONTE: A autora, 2016 (*Software CancerGene*).

De acordo com a análise realizada, os cálculos de risco de que o probando seja portador de uma mutação deletéria em um dos genes *BRCAs*, responsáveis por cerca de 40% dos casos de câncer de mama e ovário hereditários, é bastante baixa, da ordem de 0,3%. Além disso, o risco de um novo câncer na mama contralateral é da ordem de 0,7% em cinco anos (aos 60 anos) aumentando progressivamente com a idade e chegando aos 4,8% aos seus 85 anos de idade.

Todos os outros cálculos de risco para cânceres hereditários tais como os de ovário, colorretal, endométrio e melanoma estão no mesmo nível da população em geral e a probabilidade de mutações nos genes relacionados a estes tipos de câncer mostraram-se desprezível. Sendo assim, consideramos esta família como de baixo risco, com padrão não sugestivo de câncer hereditário e elaboramos um laudo final excluindo a análise molecular neste momento.

#### 6.2.2 Família Menonita da Colônia de Witmarsum 2 (Wit02)

Será descrita após a Família Wit10.

### 6.2.3 Família Menonita da Colônia de Witmarsum 3 (Wit03)

O probando é uma mulher de 57 anos, H.W.D (III-4). Identificamos seu caso pessoal de diagnóstico de carcinoma ductal invasor na mama esquerda aos 44 anos de idade tendo sido submetida à quadrantectomia, quimioterapia e radioterapia além do uso de Tamoxifeno por cinco anos. Aos 28 anos de idade foi diagnosticada com mioma e realizou histerectomia e aos 56 anos com pólipos intestinais sendo que a biópsia foi negativa para malignidade. Tem duas filhas, um filho e seis netos que não possuem diagnóstico de câncer. Na entrevista foi relatado o caso de sua mãe (II-6), falecida aos 79 anos, com histórico de “tumor cerebral” benigno, uma sobrinha (IV-1) falecida aos 38 anos decorrente de um câncer (relatado como melanoma com metástase no cérebro) cuja filha, de 16 anos, fez biópsia de pele para investigação de uma mancha na época da entrevista, no entanto não tivemos acesso a este resultado. Três tios paternos faleceram de câncer aos 60 (II-5), 50 (II-4) e 70 (II-3) anos de idade, mas o probando não soube informar os tipos. Uma prima (III-1) por parte de pai teve diagnóstico de câncer de estômago por volta dos 60 anos de idade, filha de pai com suposto diagnóstico de câncer.

A partir destas e outras informações coletadas no instante da entrevista construiu-se o heredograma desta família representado na figura 7. Além disso, foram realizados os cálculos de risco para o desenvolvimento de câncer de ovário, pâncreas, melanoma, colorretal e endométrio (FIGURA 8 e TABELA 5) e as probabilidades de haver mutação nos principais genes relacionados a estes tipos de câncer.



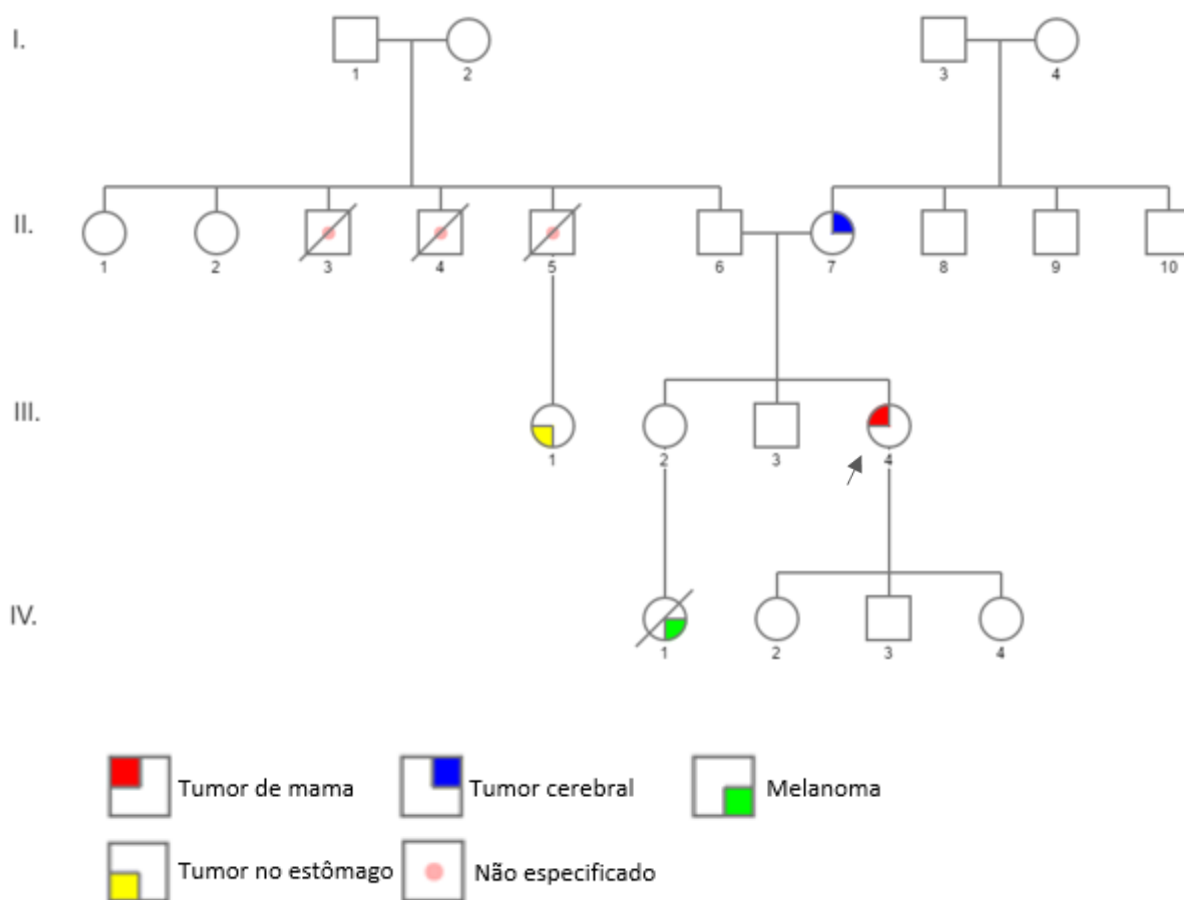


FIGURA 7 - HEREDOGRAMA DA FAMÍLIA WIT03. O probando é indicado com a flecha e os indivíduos afetados de acordo com a legenda.

FONTE: A autora, 2016 (<http://www.progenygenetics.com/>).

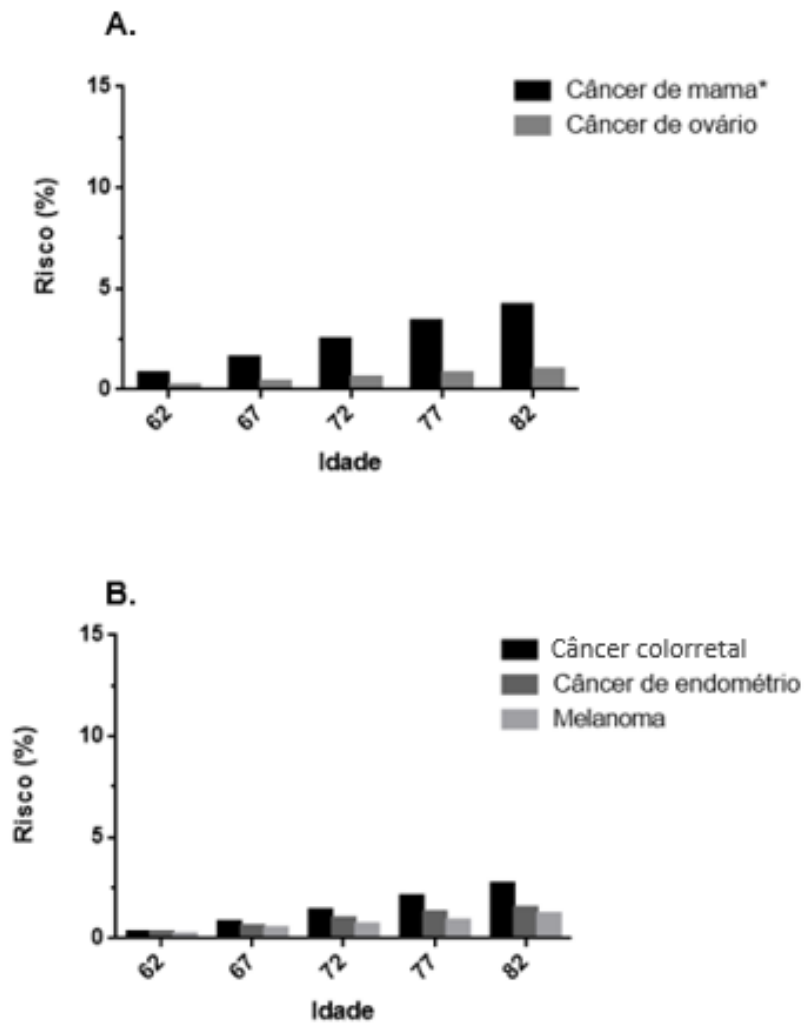


FIGURA 8 - GRÁFICOS DA PROBABILIDADE DO PROBANDO DA FAMÍLIA WIT03 DESENVOLVER ALGUNS TIPOS DE CÂNCER AO LONGO DA VIDA. **A.** Câncer de mama e ovário; **B.** Câncer colorretal, de endométrio e melanoma.

(\*) Neste caso os valores correspondem ao risco de um câncer de mama contra lateral.

FONTE: A autora, 2016 (*Software GraphPad Prism 6*).

TABELA 5 - PROBABILIDADE DE DESENVOLVIMENTO DE ALGUNS TIPOS DE CÂNCER AO LONGO DA VIDA PARA O PROBANDO DA FAMÍLIA WIT03

Idade	Câncer de mama*	Câncer de ovário	Câncer colorretal	Câncer de endométrio	Melanoma
62	0,008	0,002	0,003	0,003	0,002
67	0,016	0,004	0,008	0,006	0,005
72	0,025	0,006	0,014	0,010	0,007
77	0,034	0,008	0,021	0,013	0,009
82	0,042	0,010	0,027	0,015	0,012

(\*) Valores referentes a probabilidade de desenvolver câncer na mama contralateral.  
 FONTE: A autora, 2016 (*Software CancerGene*).

De acordo com a nossa análise, os cálculos de risco de que o probando seja portador de uma mutação deletéria em um dos genes *BRCAs* é bastante baixa, da ordem de 0,1%. O risco de um novo câncer na mama contralateral é da ordem de 0,8% em cinco anos (aos 62 anos) aumentando progressivamente com a idade e chegando aos 4,2% aos seus 85 anos de idade.

Todos os outros cálculos de risco para cânceres hereditários tais como os de ovário, colorretal, endométrio e melanoma estão no mesmo nível da população em geral e a probabilidade de mutações nos genes relacionados a estes tipos de câncer mostraram-se desprezível. Sendo assim, consideramos esta família como de baixo risco, com padrão não sugestivo de câncer hereditário e elaboramos um laudo final excluindo a análise molecular neste momento.

#### 6.2.4 Família Menonita da Colônia de Witmarsum 4 (Wit04)

O probando é uma mulher que estava com 74 anos, G.R. (III-1), quando foi realizada a entrevista sobre a história médica e familiar de sua família. Neste histórico, identificamos seu caso pessoal de Doença de Paget da mama (um tipo de câncer de mama que envolve aréolas e mamilos) aos 53 anos de idade, submeteu-se a procedimento de mastectomia e esvaziamento ganglionar; teve diagnóstico de tumor de pele do tipo basocelular e mioma aos 50 anos de idade sendo submetida ao procedimento cirúrgico de histerectomia. Na entrevista foi

relatado o caso de sua mãe (II-2) que faleceu aos 81 anos de idade e um ano antes havia sido diagnosticada com um câncer ósseo na mandíbula, a irmã (III-3) de 51 anos de idade diagnosticada com câncer de mama inflamatório aos 48 anos, teve três filhas e uma delas (IV-1) com 45 anos foi diagnosticada com câncer de mama bilateral aos 43 anos de idade submetendo-se ao processo de mastectomia profilática e posterior tratamento quimioterápico e um ano depois recebeu diagnóstico de câncer na tireoide, o irmão (III-2) de 59 anos de idade foi diagnosticado recentemente com câncer de próstata, um tio materno com diagnóstico de câncer de fígado e uma tia materna com diagnóstico de câncer de estômago, porém não soube informar as idades de diagnóstico, além disso, estes eram meios irmãos de sua mãe, um tio paterno faleceu de câncer, mas ela também não soube dizer qual o tipo e idade de diagnóstico.

A partir destas e outras informações coletadas no instante da entrevista construiu-se o heredograma desta família representado na figura 9. Além disso, foram realizados os cálculos de risco para o desenvolvimento de câncer de ovário, colorretal, endométrio e melanoma (FIGURA 10 e TABELA 6) e as probabilidades de haver mutação nos principais genes relacionados a estes tipos de câncer.

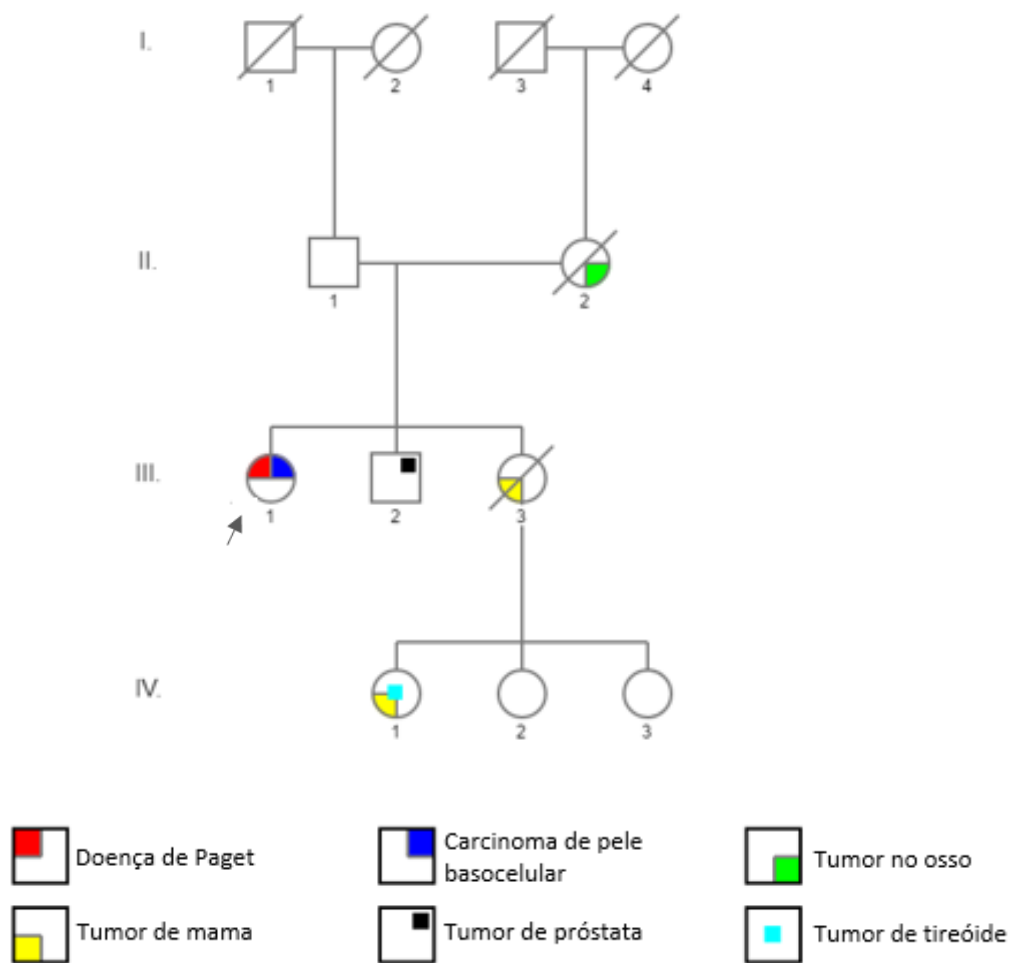


FIGURA 9 - HEREDOGRAMA DA FAMÍLIA WIT04. O probando é indicada com a flecha e os indivíduos afetados de acordo com a legenda.

FONTE: A autora, 2016 (<http://www.progenygenetics.com/>).

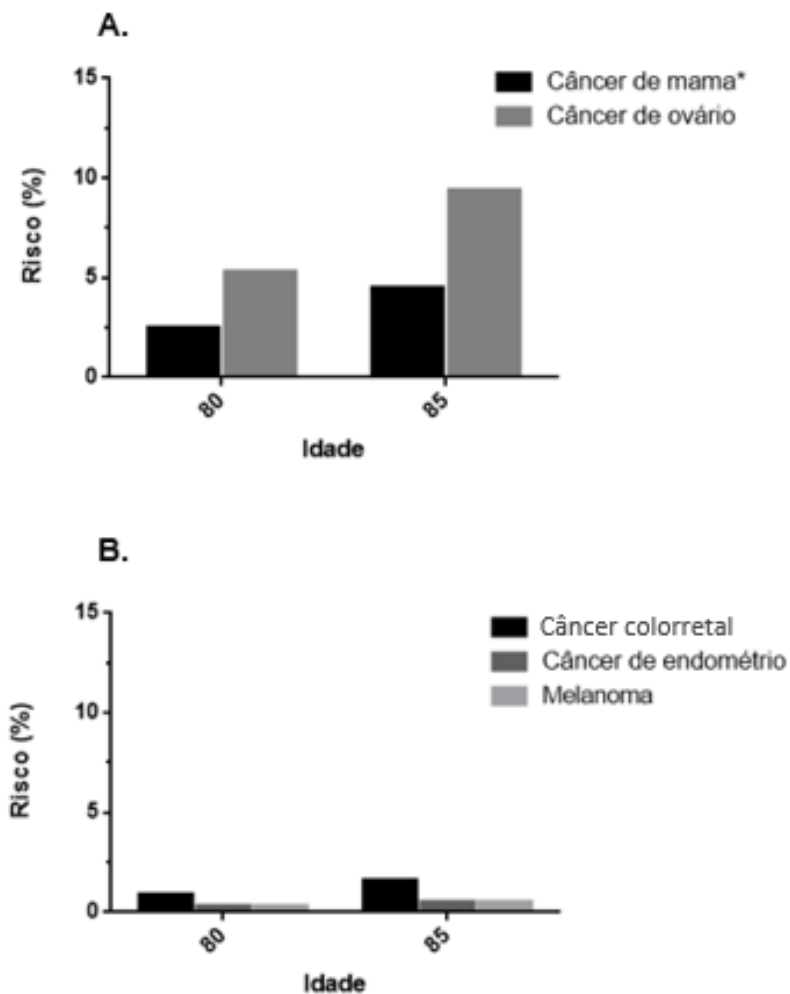


FIGURA 10- GRÁFICOS DA PROBABILIDADE DO PROBANDO DA FAMÍLIA WIT04 DESENVOLVER ALGUNS TIPOS DE CÂNCER AO LONGO DA VIDA. **A.** Câncer de mama e ovário; **B.** Câncer colorretal, de endométrio e melanoma.

(\*) Os valores correspondem ao risco de um câncer de mama contralateral.

FONTE: A autora, 2016 (*Software GraphPad Prism 6*).

TABELA 6 - PROBABILIDADE DE DESENVOLVIMENTO DE ALGUNS TIPOS DE CÂNCER AO LONGO DA VIDA PARA O PROBANDO DA FAMÍLIA WIT04

Idade	Câncer de mama*	Câncer de ovário	Câncer colorretal	Câncer de endométrio	Melanoma
80	0,025	0,053	0,009	0,003	0,003
85	0,045	0,094	0,016	0,005	0,005

(\*) Valores referentes a probabilidade de desenvolver câncer de mama contralateral.

FONTE: A autora, 2016 (*Software CancerGene*).

A partir das análises realizadas, avaliamos, através do Programa *CancerGene*, que a probabilidade do probando e seus irmãos serem portadores de uma mutação nos genes *BRCA*s é da ordem de 48,3%, o que justificaria uma investigação laboratorial, pois mostra-se acima do esperado para a população geral. Todos os demais cálculos de risco para cânceres hereditários tais como os de endométrio, coloretal e melanoma estão no mesmo nível da população em geral.

Foi oferecida a oportunidade de investigação molecular na busca por mutações nos genes *BRCA1* e 2, pois a família preenche os critérios clínicos para a Síndrome de Câncer de Mama e Ovário Hereditária. No entanto, o probando declinou do convite e um laudo com as informações acima foi elaborado e entregue.

#### 6.2.5 Família Menonita da Colônia de Witmarsum 5 (Wit05)

O probando é uma mulher de 57 anos, O.J. (III-9), quando foi realizada a entrevista sobre a história médica e familiar de sua família. Neste histórico, identificamos seu caso pessoal de leucemia mielóide aguda aos 43 anos de idade, tendo sido submetida a tratamento quimioterápico durante seis meses, apresentou lesões benignas de mama e realizou histerectomia devido a endometriose antes de ser diagnosticada com câncer. Tem uma filha e dois filhos sem diagnóstico de câncer. Além disso, foi relatado o caso de sua mãe (II-4) com 77 anos de idade e recente histórico de “câncer de pele” chegando a realizar radioterapia (provável melanoma), seu pai (II-5) falecido aos 51 anos de idade devido a uma leucemia aguda, uma irmã (III-4) com 58 anos de idade diagnosticada com câncer de pele aos 28 anos e com um segundo episódio aos 57, um tio paterno (II-3) falecido devido a um “câncer na garganta” (sem especificação).

A partir destas e outras informações coletadas no instante da entrevista construiu-se o heredograma desta família representado na FIGURA 11. Além disso, foram realizados os cálculos de risco para o desenvolvimento de câncer de ovário, coloretal, endométrio e melanoma (FIGURA 12 e TABELA 7) e as probabilidades de haver mutação nos principais genes relacionados a estes tipos de câncer. Posteriormente foram adicionados casos de diagnóstico de

câncer de bexiga e de intestino de irmãos (III-11 e III-12) de seu marido (III-10) e de câncer no pâncreas de sua cunhada (III-13).

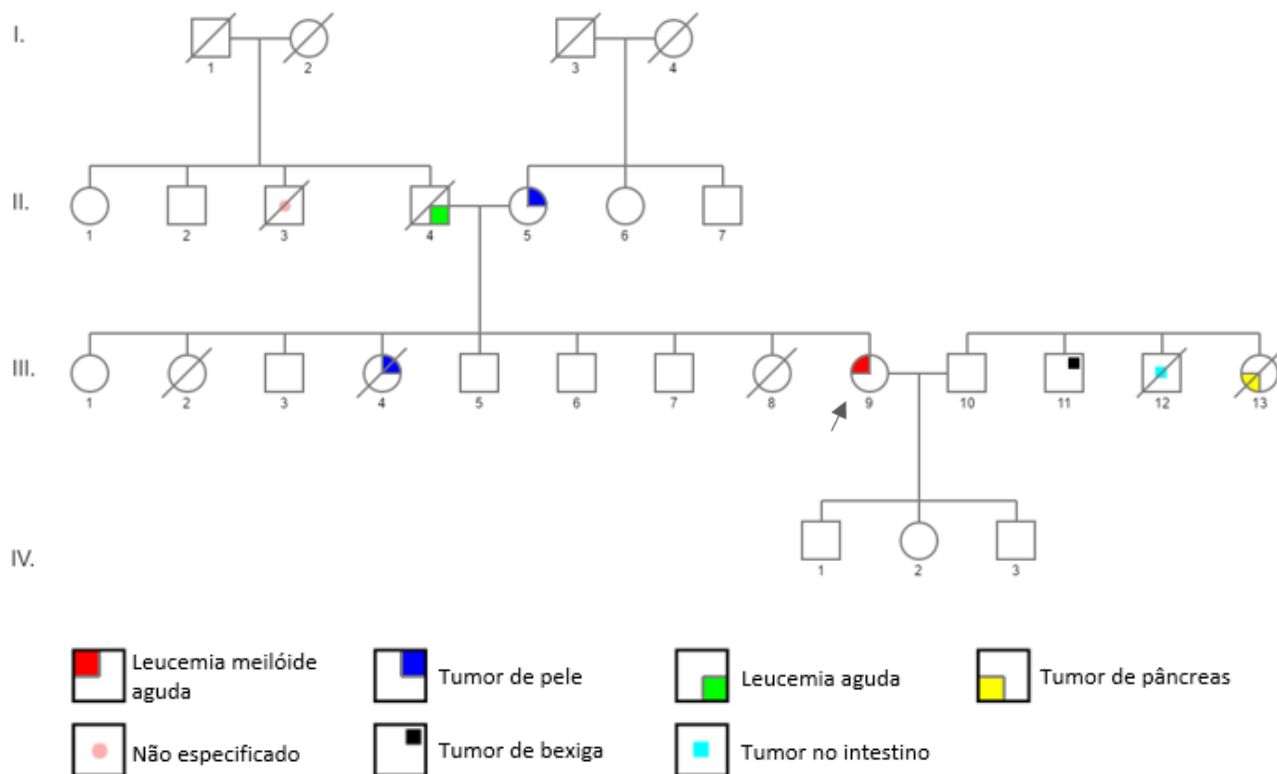


FIGURA 11 - HEREDOGRAMA DA FAMÍLIA WIT05. O probando é indicado com a flecha e os indivíduos afetados de acordo com a legenda.

FONTE: A autora, 2016 (<http://www.progenygenetics.com/>).



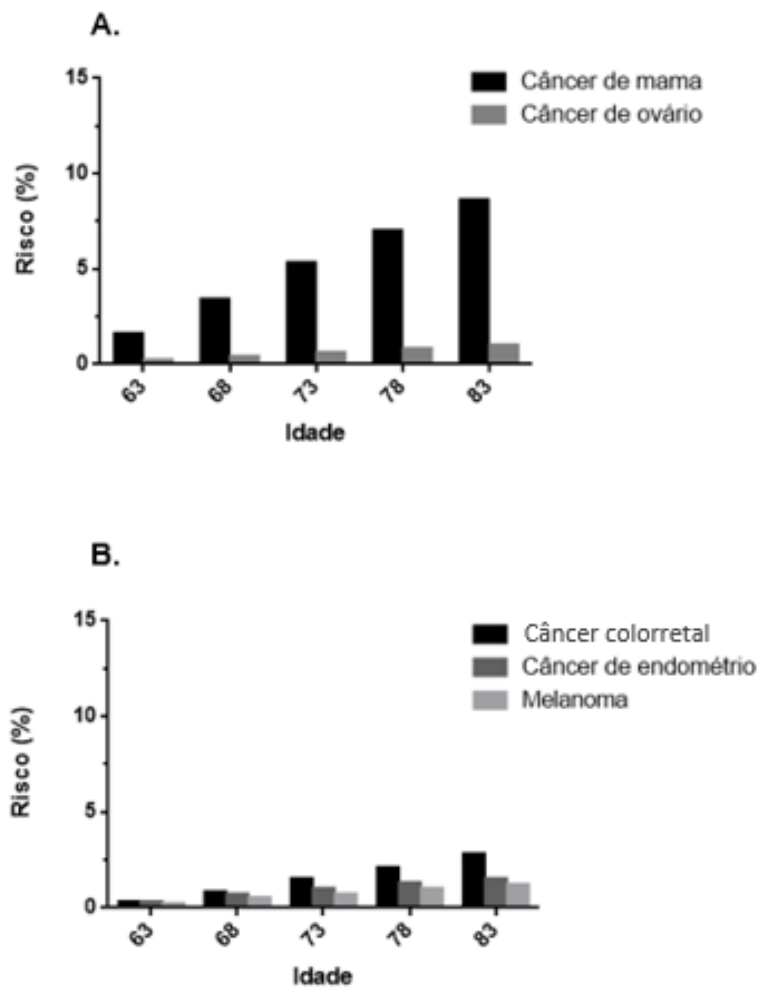


FIGURA 12 - GRÁFICOS DA PROBABILIDADE DO PROBANDO DA FAMÍLIA WIT05 DESENVOLVER ALGUNS TIPOS DE CÂNCER AO LONGO DA VIDA. **A.** Câncer de mama e de ovário; **B.** Câncer colorretal, de endométrio e melanoma.

FONTE: A autora, 2016 (*Software GraphPad Prism 6*).

TABELA 7 - PROBABILIDADE DE DESENVOLVIMENTO DE ALGUNS TIPOS DE CÂNCER AO LONGO DA VIDA PARA O PROBANDO DA FAMÍLIA WIT05

<b>Idade</b>	<b>Câncer de mama</b>	<b>Câncer de ovário</b>	<b>Câncer colorretal</b>	<b>Câncer de endométrio</b>	<b>Melanoma</b>
63	0,016	0,002	0,003	0,003	0,002
68	0,034	0,004	0,008	0,007	0,005
73	0,053	0,006	0,015	0,010	0,007
78	0,070	0,008	0,021	0,013	0,010
83	0,086	0,010	0,028	0,015	0,012

FONTE: A autora, 2016 (*Software CancerGene*).

De acordo com as análises realizadas, todos os cálculos de risco para cânceres hereditários tais como os de mama, ovário, colorretal, endométrio e melanoma estão no mesmo nível da população em geral. Além disso, todos os genes relacionados aos tipos de câncer apresentaram probabilidades de mutação desprezível. Sendo assim, consideramos esta família como de baixo risco, com padrão não sugestivo de câncer hereditário e elaboramos um laudo final excluindo a análise molecular neste momento.

#### 6.2.6 Família Menonita da Colônia de Witmarsum 6 (Wit06)

O probando é uma mulher de 77 anos de idade, F.J. (III-3), quando foi realizada a entrevista sobre a história médica e familiar de sua família. Neste histórico, identificamos seu caso pessoal de câncer de pele do tipo basocelular aos 73 anos de idade, presença de pólipos intestinais benignos aos 67 anos e mioma aos 44 anos quando foi submetida ao procedimento de histerectomia. Tem três filhos sem diagnósticos de câncer. Além disso, foi relatado o caso de seu pai (II-1) falecido aos 88 anos de idade com histórico de câncer de pele do tipo basocelular diagnosticado por volta dos 80 anos, uma irmã (III-1) com 80 anos diagnosticada com tumor benigno de tireóide e um irmão (III-6) com 68 anos diagnosticado com câncer cerebral aos 63 anos de idade.

A partir destas e outras informações coletadas no instante da entrevista construiu-se o heredograma desta família representado na FIGURA 13. Além disso, foram realizados os cálculos de risco para o desenvolvimento de câncer de ovário, colorretal, endométrio e melanoma (FIGURA 14 e TABELA 8) e as probabilidades de haver mutação nos principais genes relacionados a estes tipos de câncer.

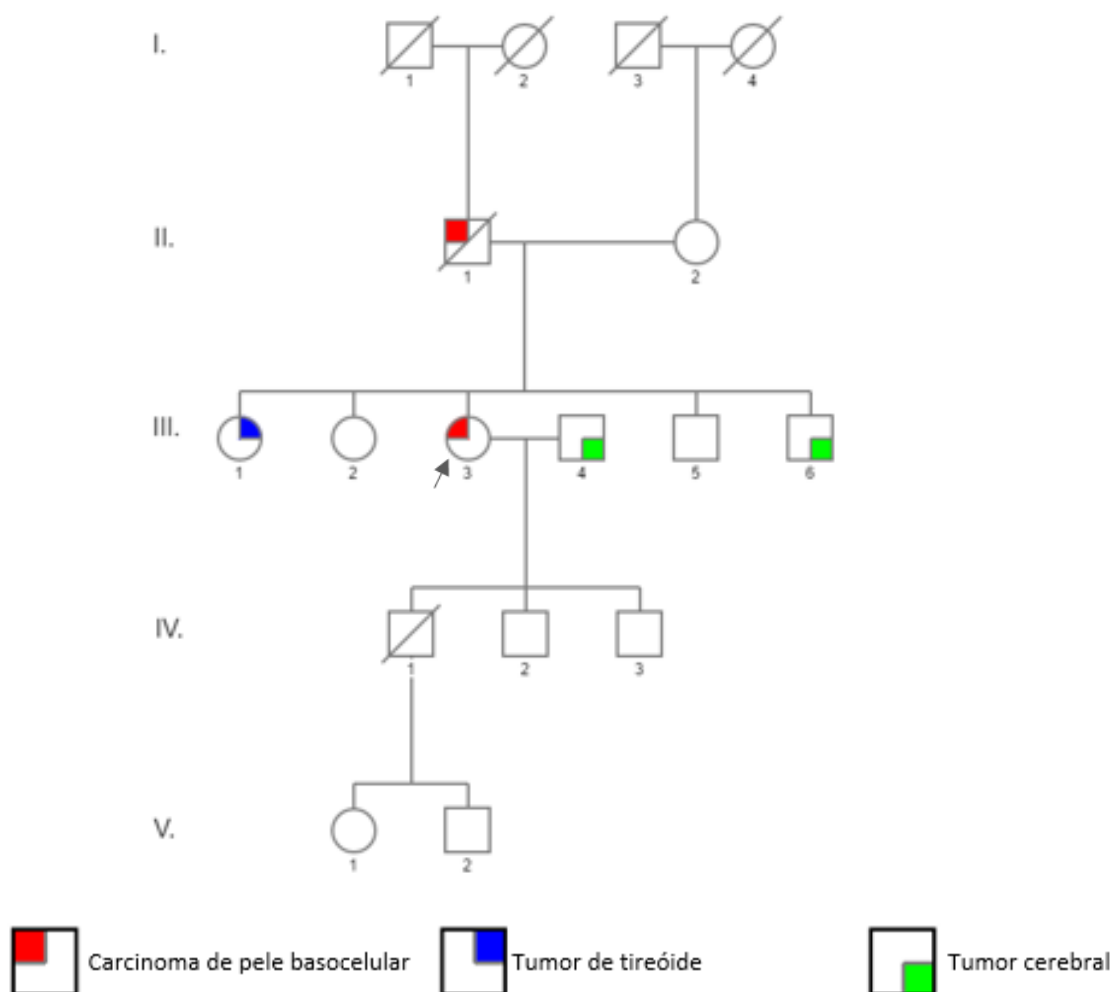


FIGURA 13 - HEREDOGRAMA DA FAMÍLIA WIT06. O probando é indicado com a flecha e os indivíduos afetados de acordo com a legenda.

FONTE: A autora, 2016 (<http://www.progenygenetics.com/>).

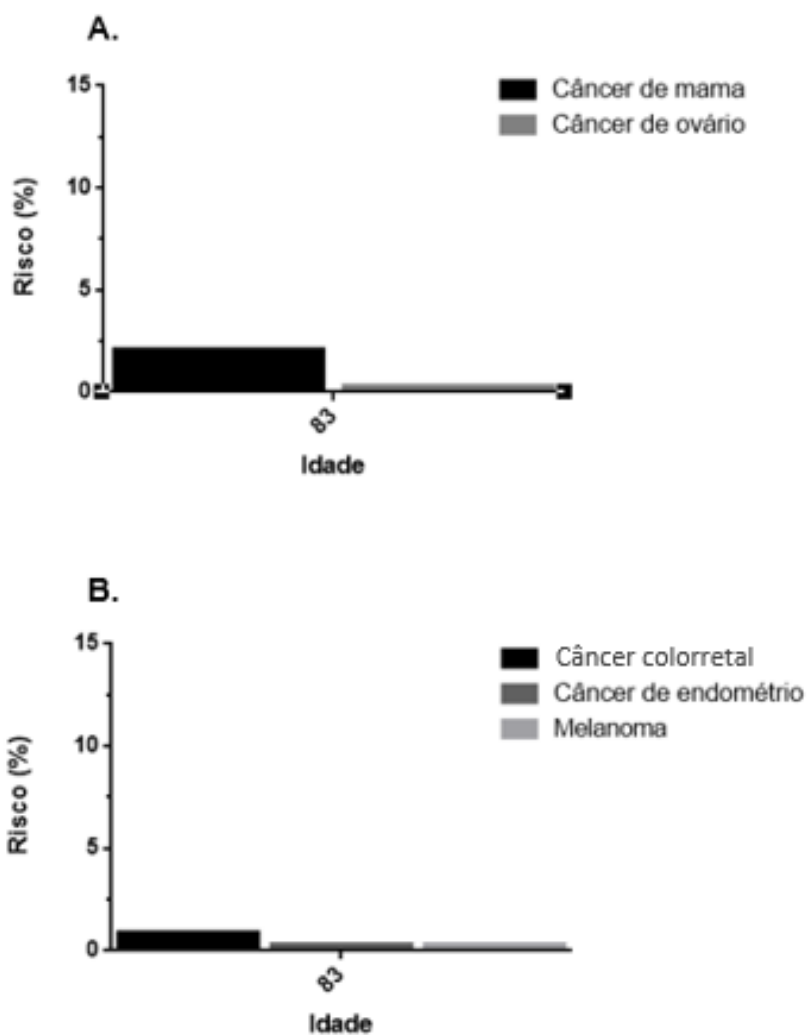


FIGURA 14 - GRÁFICOS DA PROBABILIDADE DO PROBANDO DA FAMÍLIA WIT06 DESENVOLVER ALGUNS TIPOS DE CÂNCER AO LONGO DA VIDA. **A.** Câncer de mama e ovário; **B.** Câncer colorretal, de endométrio e melanoma.

FONTE: A autora, 2016 (Software GraphPad Prism 6).

TABELA 8 - PROBABILIDADE DE DESENVOLVIMENTO DE ALGUNS TIPOS DE CÂNCER AO LONGO DA VIDA PARA O PROBANDO DA FAMÍLIA WIT06

Idade	Câncer de mama	Câncer de ovário	Câncer colorretal	Câncer de endométrio	Melanoma
83	0,021	0,003	0,009	0,003	0,003

FONTE: A autora, 2016 (Software CancerGene).

De acordo com a análise realizada, os cálculos de risco para cânceres hereditários tais como os de mama, ovário, colorretal, endométrio e melanoma estão no mesmo nível da população em geral e as probabilidades de mutação nos genes relacionados a estes mostraram-se desprezível.

Sendo assim, consideramos esta família como de baixo risco, com padrão não sugestivo de câncer hereditário e elaboramos um laudo final excluindo a análise molecular neste momento.

#### 6.2.7 Família Menonita da Colônia de Witmarsum 7 (Wit07)

O probando é uma mulher de 34 anos de idade, E.C.J. (III-4), quando a entrevista sobre a história médica e familiar de sua família foi realizada. Neste histórico, identificamos o caso de seu pai (II-5) com diagnóstico de melanoma metastático aos 60 anos de idade, um tio materno (II-7) com histórico de “câncer ósseo” (provável sarcoma) aos 72 anos de idade e um tio paterno (II-2) de 77 anos de idade com lesões de pele.

A partir destas e outras informações coletadas no instante da entrevista construiu-se o heredograma desta família representado na FIGURA 15. Além disso, foram realizados os cálculos de risco para o desenvolvimento de câncer de ovário, colorretal, endométrio e melanoma (FIGURA 16 e TABELA 9) e as probabilidades de haver mutação nos principais genes relacionados a estes tipos de câncer.

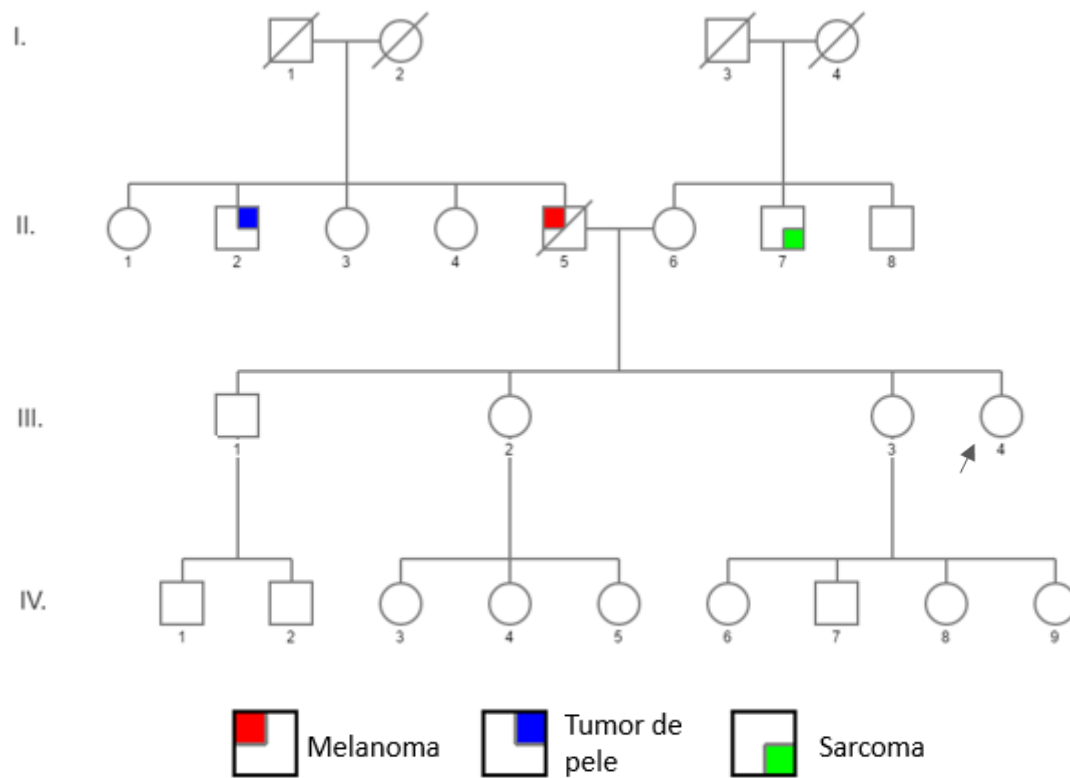


FIGURA 15 - HEREDOGRAMA DA FAMÍLIA WIT07. O probando é indicado com a flecha e os indivíduos afetados de acordo com a legenda.

FONTE: A autora, 2016 (<http://www.progenygenetics.com/>).

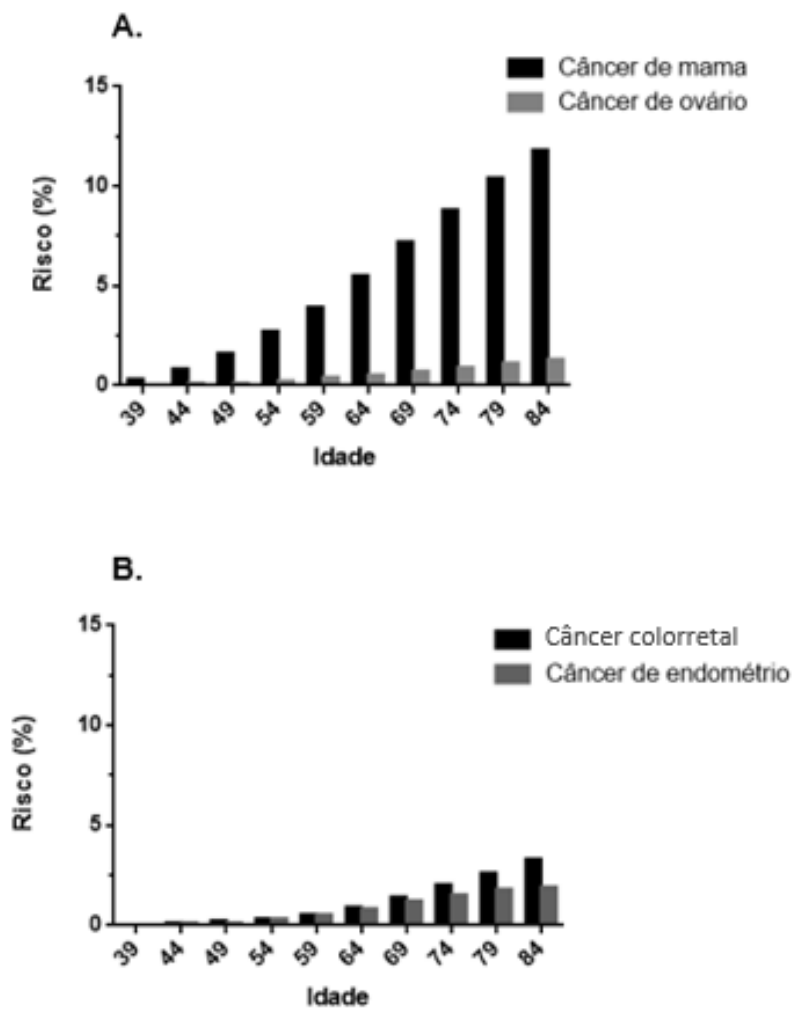


FIGURA 16 - GRÁFICOS DA PROBABILIDADE DO PROBANDO DA FAMÍLIA WIT07 DESENVOLVER ALGUNS TIPOS DE CÂNCER AO LONGO DA VIDA. **A.** Câncer de mama e ovário; **B.** Câncer colorretal e de endométrio.

FONTE: A autora, 2016 (*Software GraphPad Prism 6*).

TABELA 9 - PROBABILIDADE DE DESENVOLVIMENTO DE ALGUNS TIPOS DE CÂNCER AO LONGO DA VIDA PARA O PROBANDO DA FAMÍLIA WIT07

Idade	Câncer de mama	Câncer de ovário	Câncer colorretal	Câncer de endométrio
39	0,003	0,000	0,000	0,000
44	0,008	0,001	0,001	0,001
49	0,016	0,001	0,002	0,001
54	0,027	0,002	0,003	0,003
59	0,039	0,004	0,005	0,005
64	0,055	0,005	0,009	0,008
69	0,072	0,007	0,014	0,012
74	0,088	0,009	0,020	0,015
79	0,104	0,011	0,026	0,018
84	0,118	0,013	0,033	0,019

FONTE: A autora, 2016 (*Software CancerGene*).

Diante da análise realizada, todos os demais cálculos de risco para cânceres hereditários tais como os de mama, ovário, endométrio, colorretal e melanoma estão no mesmo nível da população em geral e a probabilidade de mutação em qualquer um dos genes relacionados ao câncer colorretal e de endométrio (*MLH1*, *MSH2* e *MSH6*) (0,1%), mostrou-se dentro do esperado para a população geral. Os demais genes relacionados aos tipos de câncer analisados mostraram-se desprezível.

Sendo assim, consideramos esta família como de baixo risco, com padrão não sugestivo de câncer hereditário e elaboramos um laudo final excluindo a análise molecular neste momento.

#### 6.2.8 Família Menonita da Colônia de Witmarsum 9 (Wit09)

O probando é uma mulher de 36 anos de idade, M.L.J. (III-3), quando foi realizada a entrevista sobre a história médica e familiar de sua família. Neste histórico, identificamos seu caso pessoal de câncer de mama (carcinoma ductal invasivo, receptores hormonais positivos e HER2 positivo) aos 28 anos de idade,



tratado com mastectomia da mama afetada, quimioterapia e Tamoxifeno por cinco anos, sendo que aos 36 anos de idade apresentou metástase óssea. Neste histórico foram identificados vários episódios de câncer de pele de sua mãe (II-2): melanoma maligno aos 40 anos, carcinoma epidermóide aos 56 e basocelular aos 58 anos. Ainda no lado materno, uma tia (II-6) falecida aos 54 anos de idade foi diagnosticada com câncer de mama aos 44 anos e dois tios (II-4 e II-5) tiveram câncer de próstata, diagnosticados aos 70 e 64 anos de idade, respectivamente. O avô paterno (I-1) falecido aos 68 anos de idade também foi diagnosticado com câncer de próstata aos 65 anos.

A partir destas e outras informações coletadas no instante da entrevista construiu-se o heredograma desta família representado na FIGURA 17. Além disso, foram realizados os cálculos de risco para o desenvolvimento de câncer de ovário, colorretal, endométrio e melanoma (FIGURA 18 e TABELA 10) e as probabilidades de haver mutação nos principais genes relacionados a estes tipos de câncer.

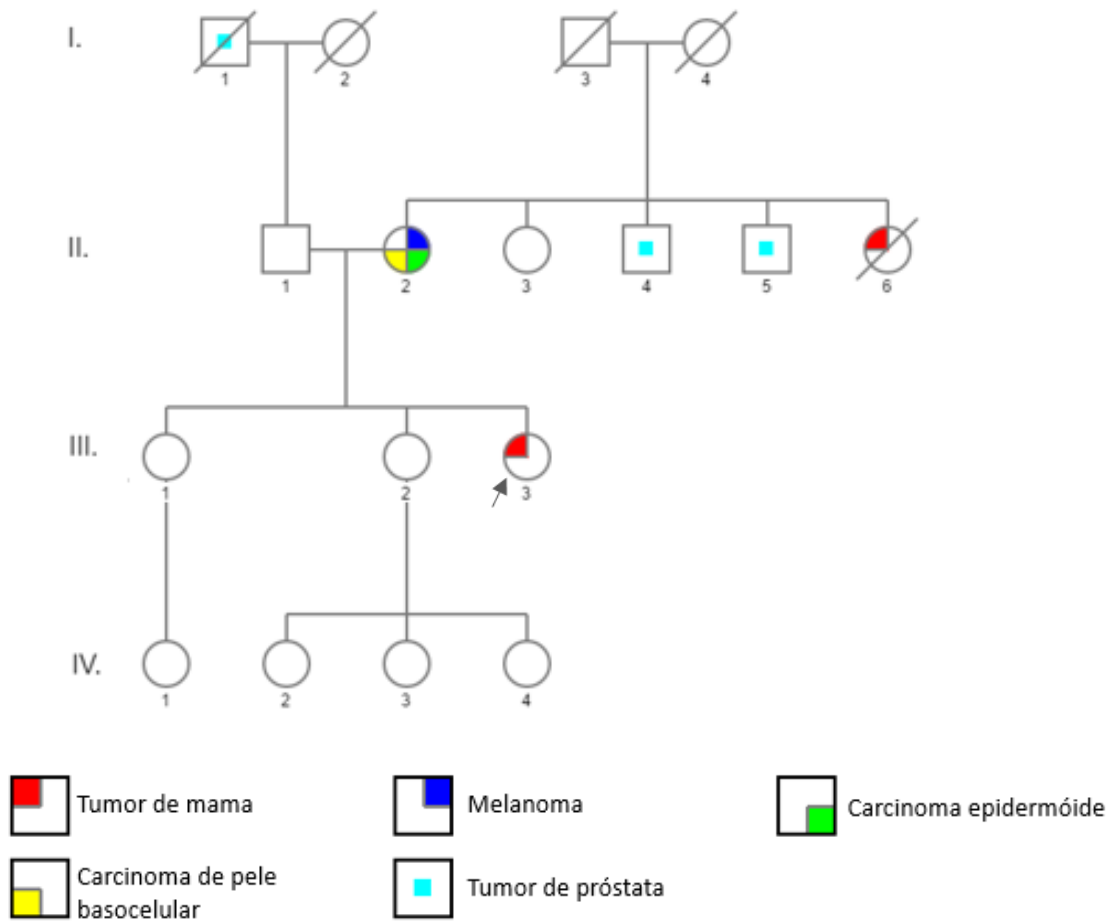


FIGURA 17 - HEREDOGRAMA DA FAMÍLIA WIT09. O probando é indicado com a flecha e os indivíduos afetados de acordo com a legenda.

FONTE: A autora, 2016 (<http://www.progenygenetics.com/>).

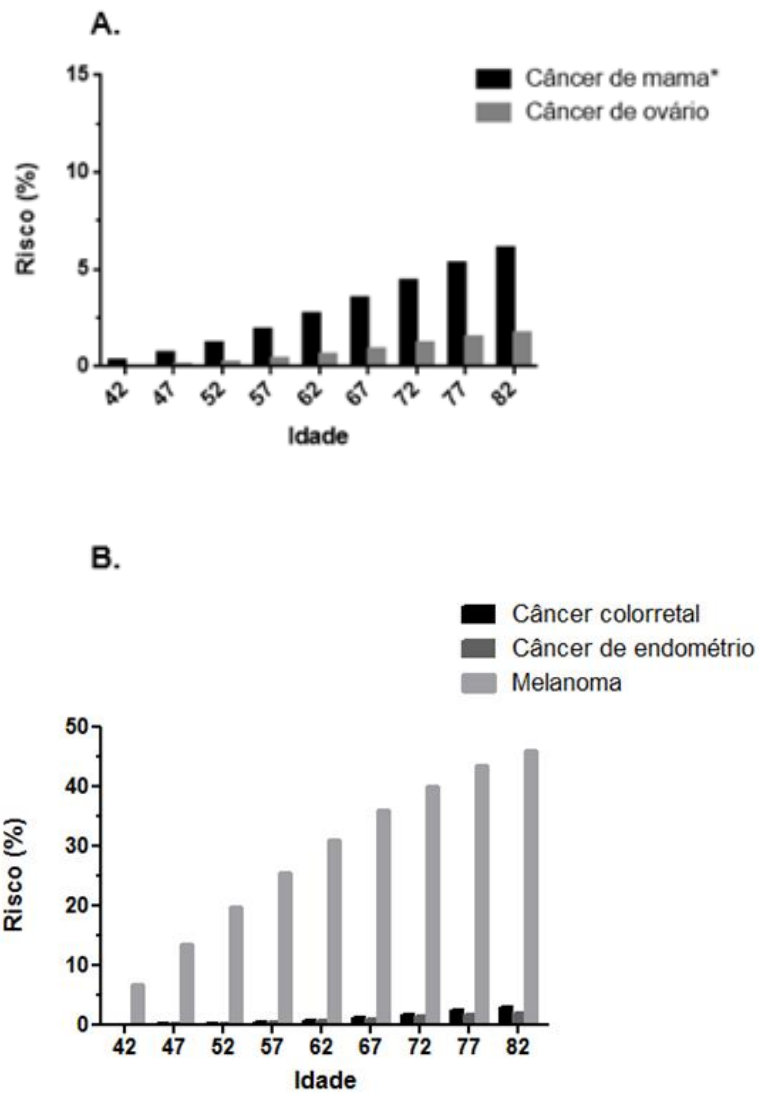


FIGURA 18 - GRÁFICOS DA PROBABILIDADE DO PRBANDO DA FAMÍLIA WIT09 DESENVOLVER ALGUM TIPO DE CÂNCER AO LONGO DA VIDA. **A.** Câncer de mama e ovário, **B.** Câncer colorretal e de endométrio.

(\*) Os valores correspondem ao risco de um câncer de mama contralateral.

FONTE: A autora, 2016 (*Software GraphPad Prism 6*).

TABELA 10 - PROBABILIDADE DE DESENVOLVIMENTO DE ALGUNS TIPOS DE CÂNCER AO LONGO DA VIDA PARA O PROBANDO DA FAMÍLIA WIT09

Idade	Câncer de mama*	Câncer de ovário	Câncer colorretal	Câncer de endométrio	Melanoma
42	0,003	0,000	0,000	0,000	0,067
47	0,007	0,001	0,001	0,001	0,133
52	0,012	0,002	0,002	0,002	0,196
57	0,019	0,004	0,004	0,004	0,255
62	0,027	0,006	0,007	0,007	0,310
67	0,035	0,009	0,011	0,010	0,358
72	0,044	0,012	0,017	0,014	0,399
77	0,053	0,015	0,024	0,017	0,433
82	0,061	0,017	0,030	0,019	0,460

(\*) Valores referentes a probabilidade de desenvolver câncer de mama contralateral.  
 FONTE: A autora, 2016 (*Software CancerGene*).

Diante das análises realizadas, avaliamos que a probabilidade do probando e seus irmãos serem portadores de uma mutação em um dos genes *BRCAs* é da ordem de 20%, o que justifica uma investigação laboratorial uma vez que esta família preenche os critérios clínicos da Síndrome Hereditária de Câncer de Mama e Ovário (HBOC). Sugerimos que, se fosse do interesse e vontade do probando, tal avaliação genética poderia ser realizada pelo nosso grupo, após autorização expressa através da assinatura de um consentimento livre e esclarecido. Deste modo a família Wit09 foi direcionada para a segunda fase do estudo. Notamos também um aumento da probabilidade de ocorrência de melanoma devido ao histórico familiar e o gene *CDKN2A* também foi posteriormente avaliado.

Todos os demais cálculos de risco para cânceres hereditários tais como os de endométrio e colorretal estão no mesmo nível da população em geral e a probabilidade de mutação nos genes correspondentes foram desprezíveis.

O sequenciamento de exoma deste indivíduo foi realizado no Instituto Pele Pequeno Príncipe. A análise compreendeu 115 genes, relacionados com câncer (WALSH *et al.* 2011; ECONOMOPOULOU *et al.* 2015; TUNG *et al.* 2015).

Dentre os 115 genes analisados, 56 apresentaram 124 variantes sendo a maioria do tipo sinônima (55%). Na tabela 11 estão listados os demais tipos de variantes encontradas. Dentre os genes descritos na literatura como de alta penetrância para carcinomas mamários, além dos *BRCAs*, foram analisados também os genes *CDH1*, *PALB2*, *PTEN*, *STK11*, *TP53*, *CHEK2*, *NBN*, *NF1* (WEITZEL, 2015).

Dentre as variantes encontradas no gene *BRCA1* uma promove alteração do quadro de leitura (*frameshift*) através da deleção de uma adenina (A) no exon 11 (c.1961delA, p.K645fs). Esta é uma alteração já descrita na literatura como patogênica, ou seja, responsável pelo desenvolvimento do tumor mamário relatado por este indivíduo. Além disso, outras variantes relacionadas a Síndrome de Câncer de Mama e Ovário Hereditárias (rs799917, rs16941, rs16942, rs1799966) foram encontradas sendo classificadas como benignas de acordo com parâmetros estipulados pelo *American College of Medical Genetics and Genomics* (RICHARDS *et al.*, 2015). Assim como variantes, também benignas, relacionadas à outras condições genéticas como Neoplasia Endócrina Múltipla (*MEN1* - rs2959656), Síndrome de Lynch (*MSH2* - rs63750327 e *MSH6* - rs1042821), carcinoma de cólon (*MUTYH* - rs3219489), uma variante relacionada com resposta à droga cisplatina (*XPC* - rs2228001) e uma classificada como fator de risco para o desenvolvimento de Melanoma Maligno Cutâneo (*XRCC3* - rs861539). Além disso, sete variantes foram observadas neste indivíduo, mas não encontradas em bancos de dados até o momento da finalização deste estudo, sugerindo serem novas alterações.

TABELA 11 - VARIANTES ENCONTRADAS EM 34 GENES EM M. L. J (III-3), EXCLUINDO AS SINÔNIMAS.

Gene	Cromossomo	Exon	rs	Tipo	Frequência na população européia (%)	Genótipo	NM	Variante
<i>AIP</i>	11	5	641081	Não sinônima	0 (C)	AC	NM_0013029 59	c.C505A, p.Q169K
		6	4930199	Não sinônima	0 (A, C)	AG	NM_0013029 59	c.A743G, p.Q248R
<i>APC</i>	5	17	459552	Não sinônima	23 (T)	AT	NM_0011275 10	c.T5465A, p.V1822D
<i>ATM</i>	11	40	659243	Não sinônima	0 (A)	GG	NM_000051	c.A5948G, N1883S
<i>ATR</i>	10	4	2227928	Não sinônima	41 (A)	AG	NM_001184	c.T632C, p.M211T
<i>BARD1</i>	2	4	2229571	Não sinônima	36 (C)	CG	NM_000465	c.G1134C, p.R378S
<i>BLM</i>	15	3	-	<i>Frameshift</i>	-	T-	NM_000057	c.582delT, p.F194fs
		3	-	Não sinônima	-	AT	NM_000057	c.T582A, p.F194L
<i>BMPR1A</i>	10	3	11528010	Não sinônima	28 (A)	AC	NM_004329	c.C4A, p.P2T
<b><i>BRCA1</i></b>	<b>17</b>	<b>10</b>	799917	Não sinônima	36 (A)	AG	NM_007294	c.C2612T, p.P971L
			16941	Não sinônima	36 (C)	CT	NM_007294	c.A3113G, p.E1038G
			16942	Não sinônima	35 (C)	CT	NM_007294	c.A3548G, p.K1183R
			<b>80357522</b>	<b><i>Frameshift</i></b>	-	<b>T-</b>	<b>NM_007294</b>	<b>c.1961delA, p.K645fs</b>
		15	1799966	Não sinônima	36 (C)	CT	NM_007294	c.A4837G, p.S1613G
<i>BRCA2</i>	13	14	69547	Não sinônima	0 (T)	CC	NM_000059	c.T7397C, p.V2466V
<i>BRIP1</i>	17	19	4986764	Não sinônima	44 (A)	AG	NM_032043	c.T2755C, p.S919P
<i>BUB1B</i>	15	8	1801376	Não sinônima	31 (G)	AG	NM_001211	c.G1046A, p.R349Q
<i>EGFR</i>	7	13	2227983	Não sinônima	28 (A)	AG	NM_005228	c.G1562A, p.R521K
<i>EPCAM</i>	2	3	1126497	Não sinônima	47 (C)	CT	NM_002354	c.T344C, p.M115T

<i>ERBB2</i>	17	12	-	<i>Frameshift</i>	-	G -	NM_0012899 37	c.1405_1406insG, p.H469fs
		17	1136201	Não sinônima	25 (G)	AG	NM_0012899 37	c.A1963G, p.I655V
		27	1058808	Não sinônima	33 (C)	CG	NM_0012899 37	c.C3508G, p.P1170A
<i>EXO1</i>	1	11	1047840	Não sinônima	37 (A)	AT	NM_003686	c.G1765A, p.E589K
		12	1635498	Não sinônima	3 (C)	CT	NM_003686	c.C2167T, p.R723C
		13	9350	Não sinônima	15 (T)	CT	NM_003686	c.C2270T, p.P757L
<i>FANCA</i>	16	9	7190823	Não sinônima	40 (C)	CT	NM_000135	c.A796G, p.T266A
		16	2239359	Não sinônima	41 (T)	CT	NM_000135	c.G1501A, p.G501S
		26	7195066	Não sinônima	32 (T)	CT	NM_000135	c.G2426A, p.G809D
<i>GALNT12</i>	9	1	1137654	Não sinônima	9 (A)	AT	NM_024642	c.A356T, p.E119V
<i>KIF1B</i>	1	21	41274458	Não sinônima	2 (T)	GT	NM_183416	c.G2421T, p.M807I
<i>MEN1</i>	11	10	2959656	Não sinônima	1 (T)	CT	NM_000244	c.A1636G, p.T546A
<i>MSH2</i>	2	3	63750327	Não sinônima	-	AG	NM_000251	c.A593G, p.E198G
<i>MSH3</i>	5	1	201874762	<i>Inframe</i>	-	GCAGCG GCTGCA GCGGCC	NM_002439	c.154_171del, p.52_57del
			3045983	<i>Inframe</i>	-	CCCCCA GCT -	NM_002439	c.196_204del, p.66_68del
			1650697	Não sinônima	24 (A)	AG	NM_002439	c.A235G, p.I79V
		21	184967	Não sinônima	14 (A)	AG	NM_002439	c.A2846G, p.Q949R
		23	26279	Não sinônima	28 (G)	AG	NM_002439	c.G3133A, p.A1045T
<i>MSH6</i>	2	1	1042821	Não sinônima	18 (A)	AG	NM_000179	c.G116A;p.G39E
<i>MUTYH</i>	1	12	3219489	Não sinônima	24 (G)	CG	NM_0010481 71	c.G972C, p.Q324H

<i>PDGFRA</i>	4	22	-	Não sinônima	-	A-	NM_006206	c.2980delA, p.K994fs
<i>PMS2</i>	7	11	2228006	Não sinônima	12 (T)	CT	NM_000535	c.A1621G, p.K541E
<i>PTCH1</i>	9		-	Não sinônima	-			
<i>RAD51D</i>	17	6	4796033	Não sinônima	13 (T)	CT	NM_002878	c.G494A, p.R165Q
<i>RB1</i>	13	1	-	<i>Frameshift</i>	-	A-	NM_000321	c.10delA:p.K4fs
			-	Não sinônima	-	AC	NM_000321	c.A10C:p.K4Q
<i>TP53</i>	17	4	1042522	Não sinônima	29 (G)	CC	NM_000546	c.C215G, p.P72H
<i>TSHR</i>	14	9	3783941	Não sinônima	33 (C)	AC	NM_0010180 36	c.C742A:p.R248S
		10	1991517	Não sinônima	10 (G)	CG	NM_0010180 36	c.G2181C:p.E727D
<i>TYR</i>	11	1	1042602	Não sinônima	37 (A)	AC	NM_000372	c.C575A, p.S192Y
<i>WRN</i>	8	26	1801195	Não sinônima	44 (T)	GT	NM_000553	c.G3222T, p.L1074F
		34	1346044	Não sinônima	23 (T)	CT	NM_000553	c.T4099C, p.C1367R
<i>XPC</i>	3	16	2228001	Não sinônima	40 (G)	GT	NM_004628	c.C2815A, p.Q939K
<i>XRCC3</i>	14	7	861539	Não sinônima	39 (A)	AG	NM_0011001 18	c.C722T:p.T241M

Em negrito a variante patogênica identificada em *BRCA1*.

FONTE: *Software* IGV, Ensembl (2016)



### 6.2.9 Família Menonita da Colônia de Witmarsum 10 (Wit10)

O probando é uma mulher de 42 anos de idade, E.H. (III-5), quando foi realizada a entrevista sobre a história médica e familiar de sua família. Neste histórico, identificamos o caso de seu pai (II-3) falecido aos 74 anos diagnosticado com câncer linfático (sem especificação de classificação) aos 70 anos de idade. Foi submetido a tratamento quimioterápico, porém três anos depois apresentou recidiva. Um irmão (III-3) faleceu aos 43 anos diagnosticado com câncer de pulmão, porém era HIV positivo, o que pode ter favorecido o aparecimento deste tumor. Uma tia paterna (II-1) com 70 anos apresentou um provável câncer de colo de útero, um tio (II-2) falecido com cerca de 45 anos foi diagnosticado com câncer de cabeça e pescoço (não especificado).

A partir destas e outras informações coletadas no instante da entrevista construiu-se o heredograma desta família representado na FIGURA 19. Além disso, foram realizados os cálculos de risco para o desenvolvimento de câncer de ovário, colorretal, endométrio e melanoma (FIGURA 20 e TABELA 12) e as probabilidades de haver mutação nos principais genes relacionados a estes tipos de câncer.

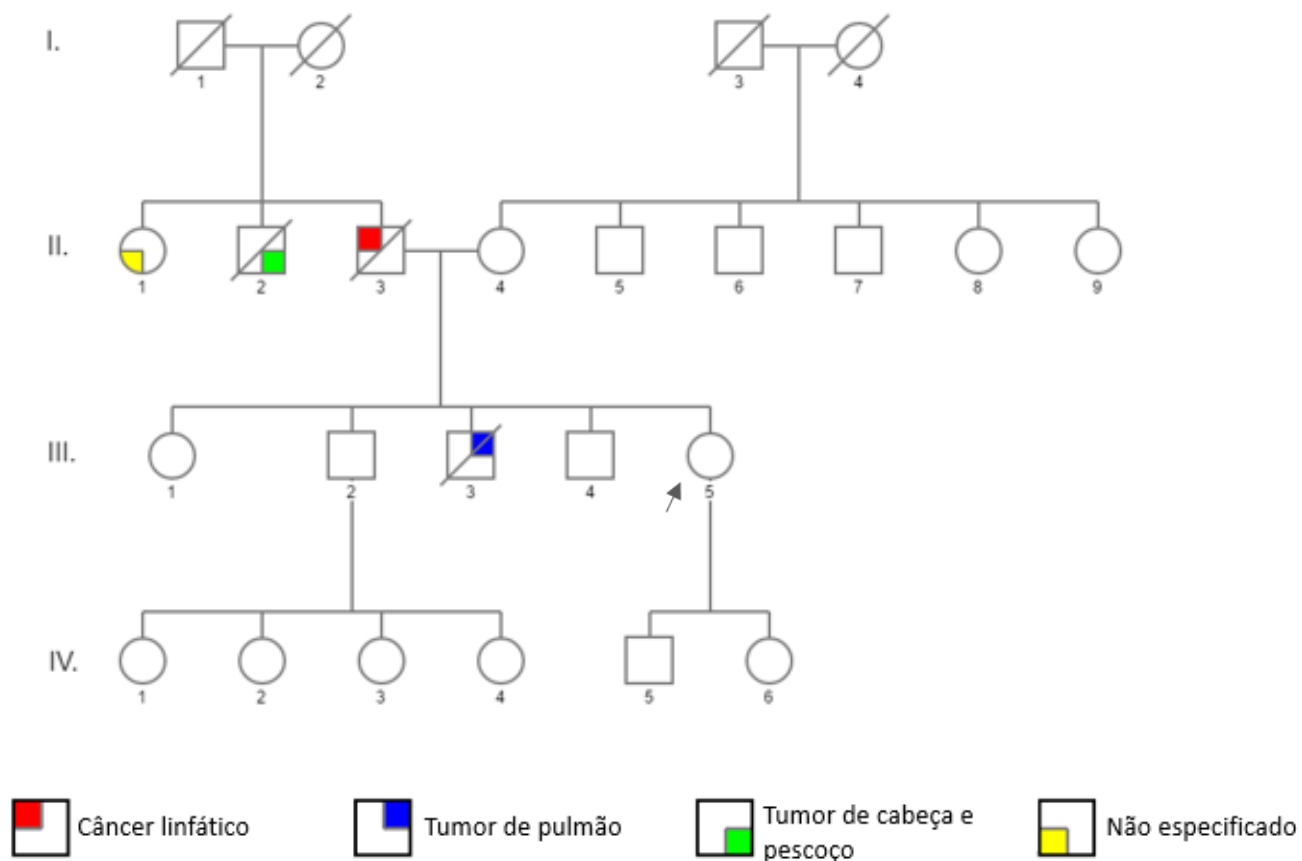


FIGURA 19 - HEREDOGRAMA DA FAMÍLIA WIT10. O probando é indicado com a flecha e os indivíduos afetados de acordo com a legenda.

FONTE: A autora, 2016 (<http://www.progenygenetics.com/>).

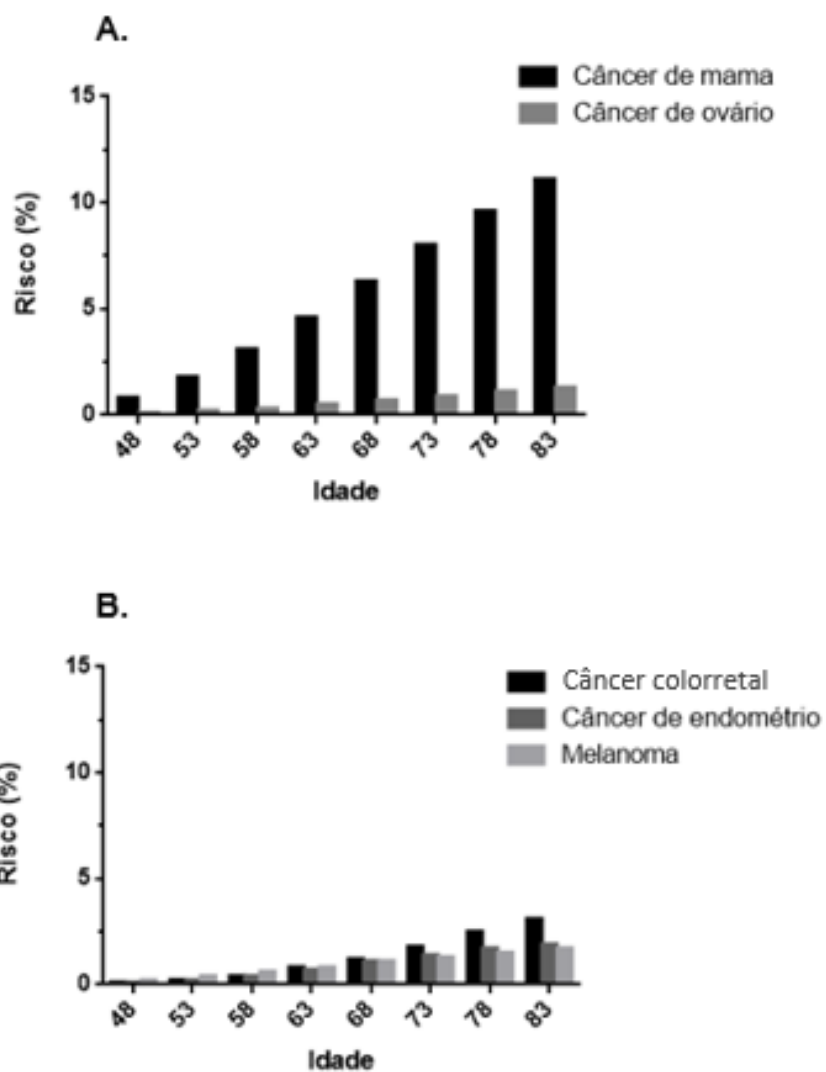


FIGURA 20 - GRÁFICOS DA PROBABILIDADE DO PROBANDO DA FAMÍLIA WIT010 DESENVOLVER ALGUM TIPO DE CÂNCER AO LONGO DA VIDA. **A.** Câncer de mama e de ovário, **B.** Câncer colorretal, de endométrio e melanoma.

FONTE: A autora, 2016 (*Software GraphPad Prism 6*).

TABELA 12 - PROBABILIDADE DE DESENVOLVIMENTO DE ALGUNS TIPOS DE CÂNCER AO LONGO DA VIDA PARA O PROBANDO DA FAMÍLIA WIT10

Idade	Câncer de mama	Câncer de ovário	Câncer colorretal	Câncer de endométrio	Melanoma
48	0,008	0,001	0,001	0,001	0,002
53	0,018	0,002	0,002	0,002	0,004
58	0,031	0,003	0,004	0,004	0,006
63	0,046	0,005	0,008	0,007	0,008
68	0,063	0,007	0,012	0,011	0,011
73	0,080	0,009	0,018	0,014	0,013
78	0,096	0,011	0,025	0,017	0,015
83	0,111	0,013	0,031	0,019	0,017

Fonte: A autora, 2016 (*Software CancerGene*)

Diante da análise realizada, os cálculos de risco para cânceres hereditários tais como os de mama, ovário, colorretal, endométrio e melanoma estão no mesmo nível da população em geral. Os demais genes relacionados aos outros tipos de câncer mostraram-se desprezível. Sendo assim, consideramos esta família como de baixo risco, com padrão não sugestivo de câncer hereditário e elaboramos um laudo final excluindo a análise molecular neste momento.

#### 6.2.10 Família Menonita da Colônia de Witmarsum 2 (Wit02)

Nesta família foram entrevistados sobre a história familiar e médica, inicialmente, três integrantes levando a elaboração do heredograma representado na FIGURA 21. A primeira foi uma mulher de 52 anos, M.M. (III-19), que nasceu na cidade de Bagé no Estado do Rio Grande do Sul. Identificamos seu caso pessoal de tumor no cérebro, descrito como uma lesão expansiva intraventricular à esquerda, provavelmente um astrocitoma sub-epidermal segundo relato da própria paciente, com diagnóstico aos 34 anos de idade. Apresenta também manchas café-com-leite e neurofibromas distribuídos

pelo corpo (FIGURA 22A). É mãe de três filhas: L.M. (IV-18), de 35 anos de idade, foi diagnosticada com “mixofibrossarcoma de grau II na coxa direita” (laudo do Hospital Erasto Gaertner, datado de 19/10/2005), aos 25 anos de idade e tratado com amputação do membro. Também apresenta diversos neurofibromas e manchas café-com-leite. P.M. (IV-19), 29 anos, diagnosticada com tumor no nervo óptico (provável glioma segundo o laudo anatomopatológico de 13/03/2013) diagnosticado aos 10 anos de idade, também apresenta manchas café-com-leite e neurofibromas distribuídos pelo corpo (FIGURA 22B). Notou-se, além dos sinais característicos presentes em outros familiares, sinais sugestivos de Síndrome de Noonan (FIGURA 22C e D). A Síndrome de Noonan apresenta grande variabilidade fenotípica (NOONAN, 1963; ALLANSON *et al.*, 1985). Indivíduos portadores possuem distinções faciais características como face triangular, hipertelorismo ocular, ptose palpebral, fissura palpebral externa desviada para baixo, implantação baixa e rotação incompleta do pavilhão auricular, micrognatia e pescoço curto ou alado, além de baixa estatura, problemas cardíacos, linfáticos e atraso de desenvolvimento. Esta doença pode ser consequente da presença de mutações em importantes genes da via de sinalização RAS-MAPK, responsável principalmente pela proliferação celular, como o *PTPN11* e os integrantes da família *RAS*. Os sinais clínicos apresentados pelo indivíduo IV-19 desta síndrome são face triangular, ptose palpebral, hipertelorismo ocular, pescoço curto, orelhas de implantação baixa e helices espessas (FIGURA 22). Por último, a filha mais nova, D.M. (IV-20), de 20 anos de idade, é aparentemente saudável, sem os sinais clínicos descritos anteriormente.

O segundo entrevistado é um homem de 36 anos de idade, D.H. (IV-13), com diagnóstico de “lesão expansiva de aspecto infiltrativo compatível com hemangioma cavernoso de palato duro” (laudo de 04/06/2013), perda progressiva de dentes, da audição e da visão do olho direito, manchas café-com-leite na região do abdômen, diafragma e membros inferiores (FIGURA 22E). Relatou o aparecimento de um provável hemangioma, elevado com diâmetro de cerca de 3 cm localizado no dorso, na altura do ombro esquerdo que foi retirado em procedimento dermatológico. Já fez dois transplantes de córnea por ceratocone, descoberto em 1994 e relatou episódios de enxaqueca com prodromos desde a infância.

O terceiro indivíduo entrevistado, E. T. H. (III-20), de 49 anos de idade sem diagnósticos de câncer. Relatou o caso de uma neta, B.G.O. (V-10), falecida aos sete anos de idade devido a um “carcinoma de plexo coroide” diagnosticado aos cinco anos, com posterior desenvolvimento de metástases em peritônio.

A partir dos relatos destes três indivíduos e com o auxílio de outros membros da família que viemos a entrevistar posteriormente, foi possível reunir muitas informações sobre a história médica pregressa desta família. Assim, identificamos também o caso do pai (II-4) dos indivíduos III-19 e III-20 que faleceu aos 54 anos devido a um tumor no fígado (os familiares não sabiam informar a idade do diagnóstico), um irmão (III-12) falecido aos 46 anos de idade com um diagnóstico de tumor no fígado que teve uma filha (IV-7) com leucemia aguda que faleceu aos 15 anos de idade, um irmão falecido aos 16 (III-18) anos de idade decorrente de um tumor no cérebro. Com relação ao indivíduo II-4 ainda foi relatado os casos de tumor cerebral de seu irmão II-1 e duas sobrinhas (III-1 e III-2), tumor no intestino de dois sobrinhos (II-3 e II-5) e um sobrinho com relato de tumor no conduto auditivo (II-6). Para todos estes relatos não nos foram apresentados os laudos.

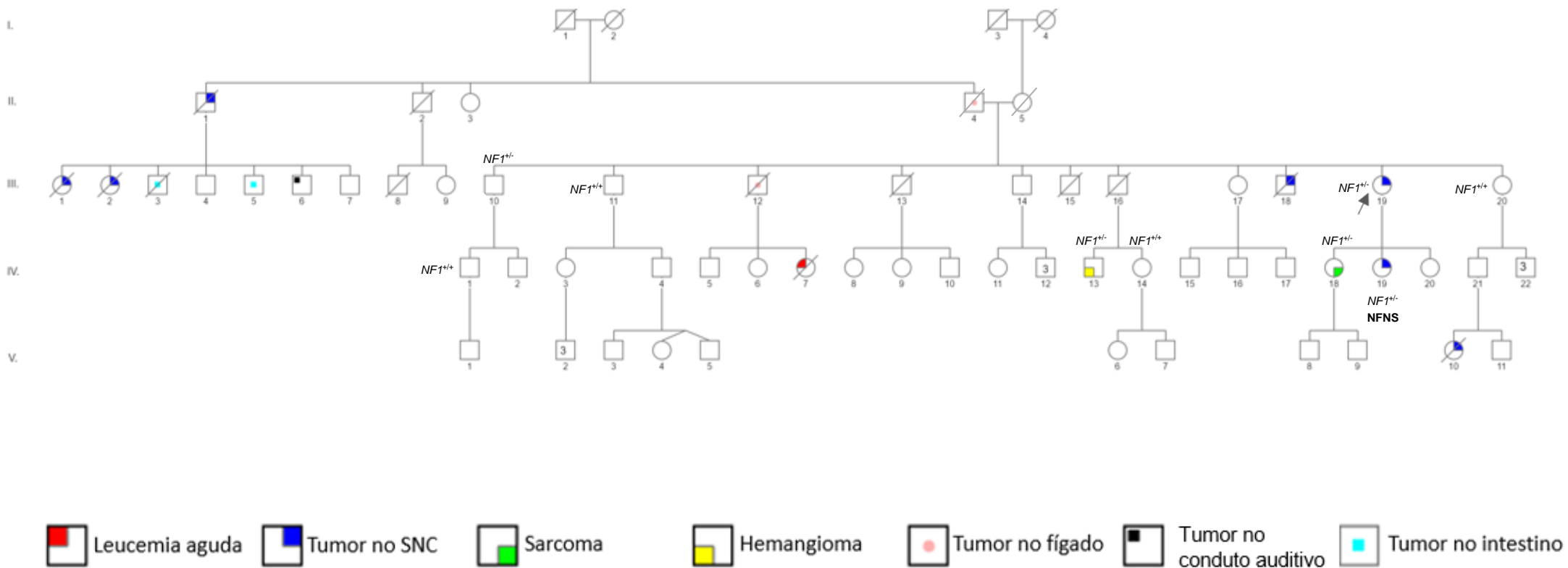


FIGURA 21 - HEREDOGRAMA DA FAMÍLIA WIT02. O probando é indicado com a flecha e os indivíduos afetados de acordo com a legenda.  
 LEGENDA: **NF1<sup>+/+</sup>** - Indivíduo homocigoto selvagem; **NF1<sup>+/-</sup>** - Indivíduo heterocigoto para a mutação c.3601delT; **NFNS**- Indivíduo portador de Neurofibromatose do tipo 1 com Síndrome de Noonan.

FONTE: A autora, 2016 (<http://www.progenygenetics.com/>).

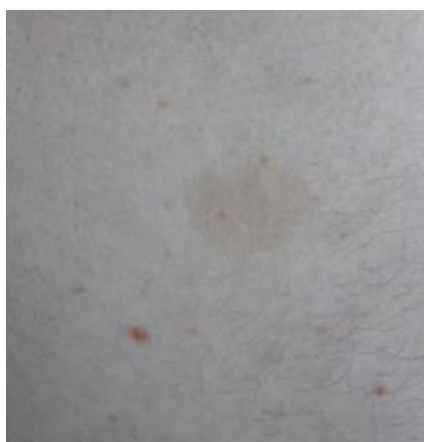
**A.****B.****C.****D.****E.**

FIGURA 22 - CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS OBSERVADAS NOS INDIVÍDUOS DA FAMÍLIA MENONITA WIT 02. **A.** Neurofibromas e manchas café-com-leite de M.M; **B.** Neurofibromas de P.M; **C.** Vista frontal do indivíduo P. M; **D.** Vista lateral do indivíduo P.M (exibição autorizada); **E.** Mancha café-com-leite do indivíduo D.H.

FONTE: A autora (2016).



Para esta família realizamos o diagnóstico clínico de Neurofibromatose do tipo I. Em uma segunda visita, confirmamos que alguns membros desta família já possuíam o diagnóstico de Neurofibromatose do tipo 1. Porém, esta família nunca havia sido investigada do ponto de vista molecular e foi convidada a participar da segunda etapa do estudo, para analisar o gene *NF1*, principal gene responsável pela manifestação da Neurofibromatose do tipo I, uma síndrome de predisposição ao câncer, conforme será discutido posteriormente.

Inicialmente dois indivíduos foram selecionados para a análise do exoma, os pacientes (IV-13 e IV-19). Na paciente (IV-19) investigou-se inicialmente, além da Neurofibromatose do tipo I, a Síndrome de Noonan. Este direcionamento se baseou em análise clínica prévia do indivíduo que exhibe características associadas com tais condições, conforme descrito acima. O segundo indivíduo da família, um homem de 36 anos (IV-13), primo da mulher relatada acima, foi selecionado devido a sua apresentação clínica bastante peculiar, com aparente distúrbio de angiogênese.

Amostras de ambos os indivíduos foram encaminhadas para o Instituto Pelé Pequeno Príncipe para a análise de exoma. O resultado deste sequenciamento indicou a existência da deleção de um nucleotídeo contendo timina no éxon 25 do gene *NF1* (NM\_001042492.2; c.3601delT; p.1073fs) em ambos os indivíduos (FIGURA 23). Esta variante provoca alteração do quadro de leitura (*frameshift*) e consequente modificação da sequência de aminoácidos que compõem a Neurofibromina, produto proteico de *NF1* (FIGURAS 23 e 24), tornando-a truncada e não funcional uma vez que um códon de parada prematuro é observado em sequência à mutação. O exon 25, onde se encontra a mutação, apresenta diversas mutações já relatadas, entre elas quatro associadas a Neurofibromatose (rs864622469, rs199474740, rs150015024, rs863224659) porém a mutação encontrada nesta família não se encontra descrita na literatura.




FIGURA 23 - ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS CDS SELVAGEM E MUTADA DA PROTEÍNA *NF1*. A flecha vermelha na vertical indica o nucleotídeo timina deletado, a flecha horizontal amarela indica o ponto onde o quadro de leitura é alterado, o retângulo vermelho indica, no DNA, a posição onde o códon de parada será formado no mRNA.

FONTE: *Software Genedoc 2.7* (2016)

```

1  MAAHRPVEVWQAVVSRFDEQLPIKGTQQNTHTKVSTEHNKECLINISKYKFSLVISGLTTILKNVNNMRIFG
2  EAAEKNLVLSQLIILDTLEKCLAGQPKDTMRLDETMLVKQLLPEICHFLHTCREGNQHAAELRNSASGVLFSL
3  CNFNFAVFSRISTRQLQELTVCSQEDVVDVHDIELQYINVDCAKLRLLKETAFKFKALKKVAQLAVINSLEKAF
4  WNWVVENYDFETKLYQIPQTDMAECAEKLFDLVDGFAESTKRKAADVWPLQIILLICPEIQQDISKDVVDENN
5  MNKFLFLDSLRLKALAGHGGSRQLTESAAIACVKLCKASTYINWEDNSVIFLLVQSMVVDLKNLLFNPKPFSR
6  GSQPADVLDLMDCLVSCFRISPHNNQHFKICLAQNSPSTFHYVLVNSLHRIITNSALDWWPKIDAVYCHSVE
7  LRNMFGETLHKAVQCGGAHPAIRMAPSLTFKEKVTSLKFEKPTDLETRSYKYLLLSMVKLIHADPKLLCNP
8  RKQGPETQGSTAELITGLVQLVPQSHMPEIAQEAMEALLVLHQLDSIDLWNPDPAPVETFWISSQMLFYIC
9  KKLTSHQMLSSTEILKWLREILICRNKFLKNKQADRSSCHFLFYGVGCDIPSSGNTSQMSMDHEELLRTPG
10 ASLRKKGKNSMDSAAAGCSGTPPICRQAQTKLEVALYMFLLWNPDEAVLVAMSCFRHLCEEADIRCGVDE
11 VSVHNLNPNYNTFMEFASVSNMMSTGRAALQKRVMLLRRIEHPHTAGNTEAWEDTHAKWEQATKLLINY
12 PKAKMEDGGAAESLHKTIVKRRMSHVSGGSDLSDDTSLQEWINMTGFLCALGGVCLQQRNSGLATYS
13 PPMGPVSRKGSMSVMSSEGNADTPVSKFMDRLLSLMVCNHEKVGQIRTNVKDLVGLLESPALYPMFL
14 NKLKNTISKFFDSQGVLLDTNTQVFEQTIAMKNLLDNHTEGSSHELQASIETMMLNLVRYVRYVGLNM
15 VHAIQIKTKLQQLVEVMMARRDDLDFCQEMKFRNKMVEYLTDWVWMTSNQAADDDVKCLTRDLQAS
16 M EAVVSLLAGLPLQPEEGDGVLEMAKSQLFLKYFTLFMNLNDLNDCEVEDESAQTGGRKRGMSRRLASLRH
17 RSQ*
18 CTLVAMSNLLNANVDSGLMHSIGLYHKDLQTRATFMEVLTKILQQGTEFDLTAETVLADRFRFELVLTVM
19 MGDQGLPIAMALANVVPSCQWDELARVLVTLFDSRHLLYQLLWNMFSKEVELADSMQTLFRGNLSASKI
20 MTFCFKYYGATYLLQKLLDPLLRIVITSSDWQHVSEVDPTRLEPSESLEENQRNLLQMTKFFHAIISSSSEFPP
21 QLRVSVCHCLYQATCHSLLNKATVKEKKNKSVVSRFPQNSIGAVGSAMFLRFINPAIVSPYEAGILDKKPP
22 PRIERGLKMLSKILQSIANHVLFTKEEHMRPFNDFVKSNFDAARRFFLDIASDCPTSDAVNHSLSFISDGNVLA
23 LHLLWNNQEKIGQYLSNRDHKAVGRRPFDKMATLLAYLGPPEHKPVADTHWSSLNLTSSKFEFEMTRH
24 QVHFKKFKALKTLSIPYQAGTSKAGNPIFYVARRPKTGOINGDLIVHVLTLKPYAKPYEIVVDLTHTGPS
25 NRFTDFLSKWVVFPGFAYDNVSAVYIYNCSWVREYTKYHERLLTGLKGSKRLVFDICPGKLAHEHEHQ
26 QKLPAAATLAEEDLVFHNALKLAHKDTKVSIVGSTAVQVTSARTKVLGGQSVFLNDIYASEIEEICLVDEN
27 QFTLTIANQGTPLTFMHQCEFAIVQSIHIRTRWELSQPDSIPQHTKIRPKDVPGLLNIALNLGSSDPSLRSA
28 AYNNLLACTCTFNLIKIEGQLLETSGLCIPANNTLFIIVSISKTLAANEPHLLTFLEECISGFSKSSIELKHLCLCYMT
29 PWLSNLVRFCKHNDDAKRQVTAIDLKLTMTINEKQMYPSIQAKIHWGSLGQITDLDVVDLDSFIKTSATGGL
30 GSIKAEVMADTAVALASGNVSLVSSKVGIRMKCKIIDKTCLSPTTLEQHLMWDDIAILARYMLMFSNNSLD
31 VAAHLPYLFHVTVFLVATGPLSLRSTHGLVINIIHSLCTCSQLHFSEETKQVRLSLTEFSLPKFYLLFGISKVKS
32 AAVIAFRSSYDRSFSPPSYERETFALTSLETVTEALLEIMEACMRDIPTCKWLDQWTELAQRFAFQYNPSLQ
33 PRALVFGCISKRVSHGQIKIIRILSKALESCLKPDTYNSQVLEATVIALTKLQPLLNKDSPLHKALFVAV
34 AVLQLEVNLYSAGTALLEQNLHTLDSLRFNDKSPSEVFMAIRNPLEWHCKQMDHFVGLNFNSNFALV
35 GHLLKGYRHPSPAIVARTVRILHTLLLVNKHRCDFEVNTQSVAYLAALLTVSEEVSRCSLKHRSLLLTDI
36 SMENVPMDTYPIHGDPSYRILKETQPWSSPKGSEGYLAATYPTVGTSPRARKSMSLDMGQPSQANTK
37 KLLGTRKSFHDHLSDTKAPKRQEMESGITPPKMRRVAETDYEMETQRISSSQQHPLRKSVSSESNVLLDEE
38 VLTDPKIQALLLVATLVKYTTDEFDQRILYEYLAESVFPKVFVPHNLLDSKINTLLSLCQDPNLLNPIHI
39 VQSVVYHEESPQQYTSYLSQSGFNGLWRFAFPFSKQTQIPDYAELIVKFLDALIDTYLPGIDEETSEESLLTPT
40 SPYPPALQSLISITANLNSNSMTSLATSQHSPIGIDKENVELSPTTGHCSGRTRHGSASQVQKQRSAGSFK
    
```

Proteína NF1 mutada

**Legenda:****M** Ponto de alteração do quadro de leitura Domínio RAS-GAP Domínio CRAL-TRIO**SSSS** - Poly-ser**KRQEMESGITPPKMRR** - Sinal de localização nuclear

— - Ligação de lipídeo

\* Stop codon

**RQS\*** - Aminoácidos formados após o ponto da mutação

FIGURA 24 - SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA NEUROFIBROMINA. O retângulo preto delimita a sequência referente a proteína neurofibromina mutada (linhas 1-16) com relação a sequência de aminoácidos completa da proteína neurofibromina normal (linhas 1-40). A sequência da proteína mutada compreende do primeiro aminoácido da sequência (M), na linha 1, até o ponto de alteração do quadro de leitura (M), na linha 16, onde a sequência **RQS\*** é incorporada.

FONTE: A autora (2016).

Posteriormente, esta variante foi confirmada por sequenciamento de Sanger em dois indivíduos (IV-13 e IV-19) e em seguida investigada em outros membros da família por meio da técnica de PCR-ARMS. Além dos indivíduos P. M (IV-19) e D. H. (IV-13) também foram analisados a mãe (III-19) e a irmã (IV-18) de P. M., o tio (III-10) que apresentava manchas café-com-leite e diversos neurofibromas, o tio (III-11), a tia (III-20), o primo (IV-1) e a irmã de D.H (IV-14). A partir desta análise os indivíduos III-10, III-19, IV-13, IV-18, IV-19 foram identificados como heterozigotos para a variante em questão e os indivíduos III-11, III-20, IV-1 e IV-14 homozigotos selvagens. Alguns estão representados na figura 25.

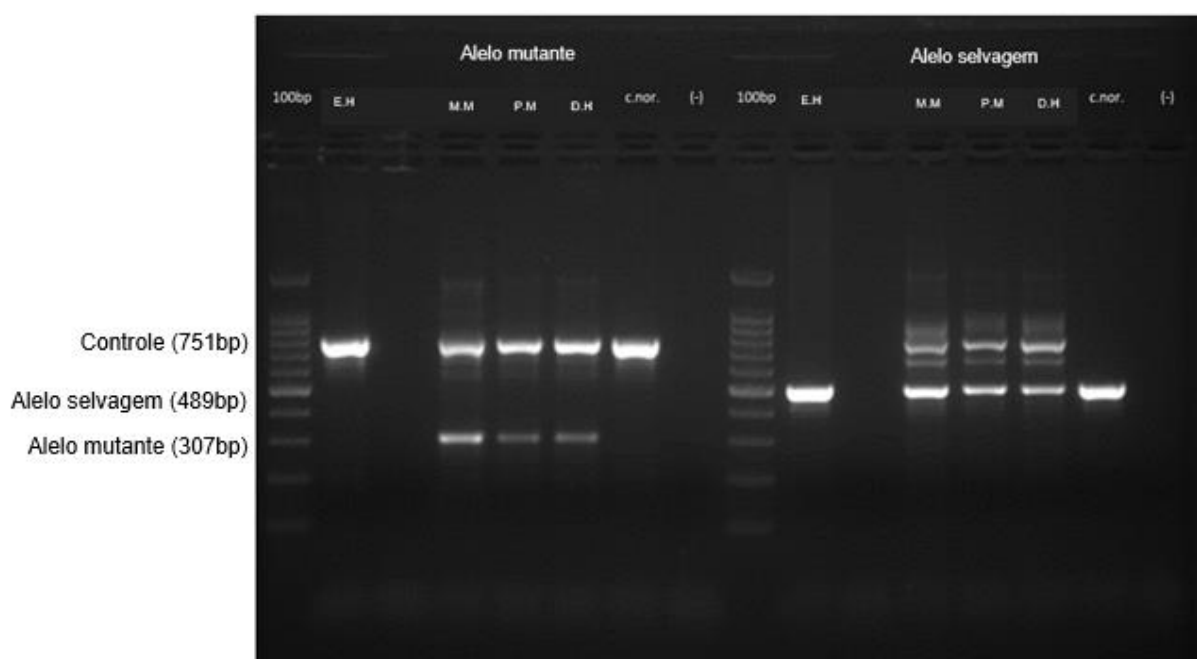


FIGURA 25 - IMAGEM DO GEL DE AGAROSE 1,5% DEMONSTRANDO OS GENÓTIPOS DOS QUATRO INTEGRANTES DA FAMÍLIA WIT 02 (Os indivíduos representados são: E.H.-III-20; M.M.-III-19; P.M.-IV-19; D.H.-IV-13).

FONTE: Instituto Pelé Pequeno Príncipe (2016).

### 6.3 ANÁLISE DA PROTEÍNA NEUROFIBROMINA

As ferramentas online *SWISS-MODEL ExPASy* e *PHYRE2* foram utilizadas para criar modelos 3D da proteína neurofibromina normal e mutada para demonstrar o efeito da mutação encontrada neste estudo. A modelagem destes programas é realizada a partir da comparação da sequência de

aminoácidos em questão com uma biblioteca de proteínas já conhecidas. Diante disto a sequência normal da neurofibromina apresentou, em ambas as ferramentas, 100% de identidade com a própria neurofibromina. Em contrapartida, a sequência da proteína com a mutação mostrou-se desconhecida, porém com similaridades a diversas outras proteínas, como a subunidade 1 da proteína *cap-binding nuclear* (18% de identidade) no *SWISS-MODEL Expasy* e a defensina-5 (50% de identidade) no *PHYRE2*. A modelagem 3D de ambas as sequências de aminoácidos da Neurofibromina 1 demonstra a diferença estrutural da proteína normal e mutada (FIGURA 26).

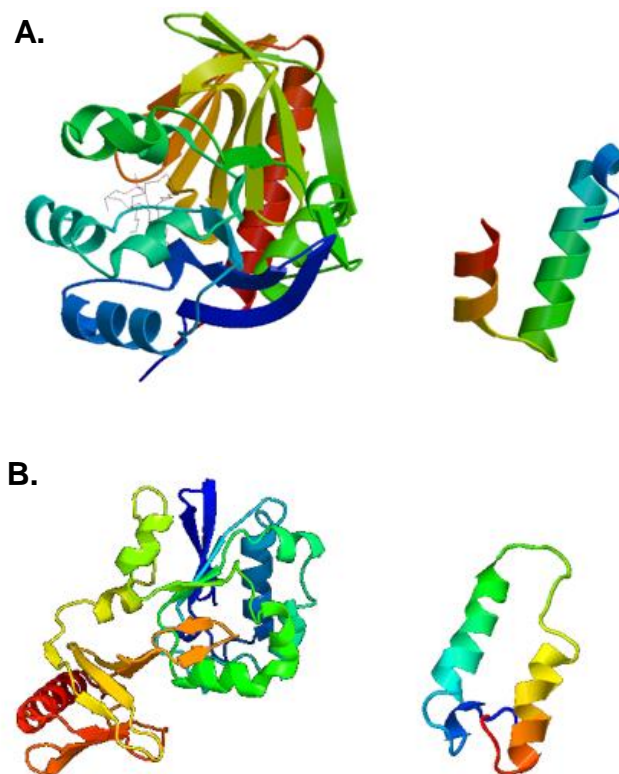


FIGURA 26 - MODELO 3D DA PROTEÍNA NEUROFIBROMINA NORMAL (À ESQUERDA) E MUTADA (À DIREITA). **A** – SWISS MODEL EXPASY, **B** – PHYRE2.

FONTE: *Swiss Model Expasy, Phyre2* (2016).

#### 6.4 ANÁLISE DO EXOMA DE DOIS INDIVÍDUOS DA FAMÍLIA WIT 02

A partir dos dados do exoma, após a análise do gene *NF1* outros genes foram avaliados, em especial àqueles relacionados às Rasopatias. Este é um termo genérico para designar doenças com fenótipos semelhantes causadas por mutações em genes que participam da via RAS/MAPK, (TIDYMAN; RAUEN, 2009; AOKI *et al.*, 2016) e serão discutidas posteriormente. Foram analisados também genes relacionados com o desenvolvimento de câncer de maneira geral, genes codificadores de proteínas que apresentam alguma relação com *NF1* (participação na mesma via, co-expressão) a partir das ferramentas *online Pathwaylinker* (2012), *STRING*® (*String Consortium* 2016, versão 10.0) e *GeneMania* (FIGURA 27), genes codificantes de proteínas relacionada à angiogênese, genes potencialmente relacionados com o desenvolvimento de hemangiomas, mal formações vasculares e linfedemas de acordo com o artigo de Blatt e colaboradores (2014) e demais genes que se mostraram interessantes por meio da análise da tabela de variantes gerada pelo *software* IGV ou por proximidade a outros genes analisados (TABELA 13).

TABELA 13 - GENES ANALISADOS NO EXOMA DOS INDIVÍDUOS IV-13 E IV-19

<b>Condição</b>	<b>Genes</b>
<b>Neurofibromatose do tipo 1 e outras Rasopatias</b>	<i>NF1, PTPN11, SOS1, SOS2, RAF1, KRAS, HRAS, NRAS, BRAF, RIT1, SHOC2, SPRED1, CBL, A2ML1, MAP2K1, MAP2K2, RASA1, LZTR1</i>
<b>Câncer</b>	<i>BRCA1, BRCA2, TP53, MYC, PTEN, CHEK1, CHEK2, CCND1, PALB2</i>
<b>Redes de interação</b>	<i>APP, MYOG, SDC2, HRAS, TBPL1, GRIN1, RRAS, NRAS, SMARCA4, GTF2B, POLR2A, BRCA1, POU2F1, RRAS2, CALM1, TIRAP, CHKB, RPS6KA1, GSK3B, IRF8, MRAS, SMARCC2, GADD45A, FOXA2, INS, ARID1A, SMARCB1, SMARCC1</i>
<b>Angiogênese</b>	<i>VEGF, VEGFA, VEGFB, VEGFC, VEGFD, PIGF, TIE1, EGF, IGF1, CSF3, PDGFA, PDGFD, FGF1, HGF, NOS1, NOS2, NOS3, TSP1, TSP2, TIMP1, TIMP2, TIMP3, TIMP4, TGFB1, TGFB2,</i>
<b>Hemangioma</b>	<i>GLMN, PTPN14, GJC2, ANTXR1, IDH1, ATR, PDCD10, PIK3CA, KDR, GNAQ, ENG, KIF11, ATM, ACVRL1, RASA1, FLT4, GJA1, CCM2, KRIT1, TEK, AKT1, IDH2, FOXC2, SMAD4, CCBE1, SOX18, IKBKG, SKI</i>
<b>Outros genes</b>	<i>MMP11, CRYBA2, DERL3, ZBTB42, SAMD11, TGFA, TGFB3, TPM1, TPM2, TPM3, TPM4, INF2, MTOR, GATA1, GATA2, GATA3, GATA4, GATA5, TIPIN, ARG2, Interleucinas</i>

FONTE: A autora (2016)

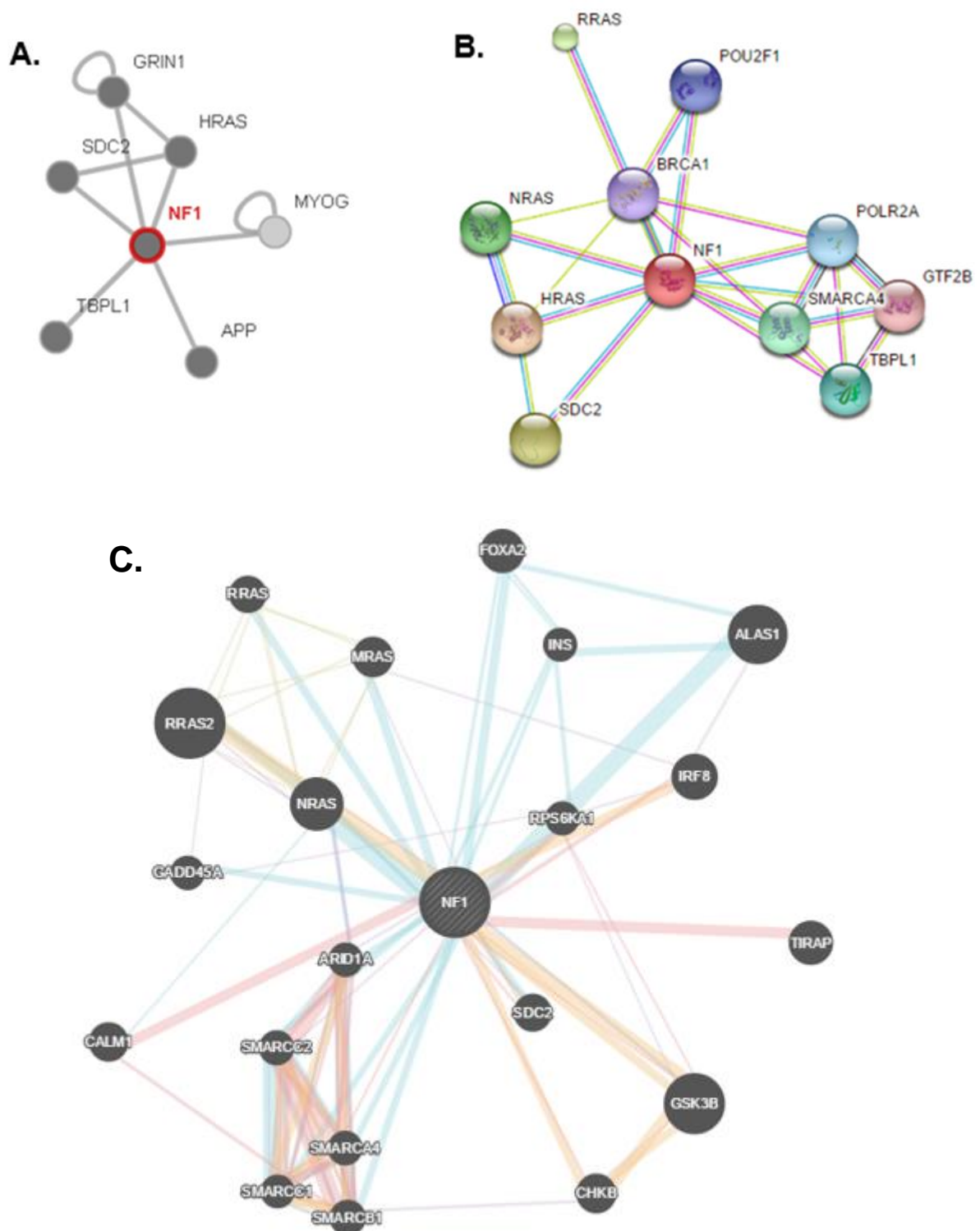


FIGURA 27 - REDES DE INTERAÇÃO DE PROTEÍNAS PARA O *NF1* CRIADAS PELAS FERRAMENTAS *Pathwaylinker* (A), *STRING* (B), *GeneMania* (C).

Nas redes criadas pelo *STRING* e *GeneMania* a cor de cada linha representa um tipo de interação. Estas podem ser consultadas nos respectivos sites: [www.string-db.org](http://www.string-db.org) e [www.genemania.org](http://www.genemania.org).

FONTE: *Pathwaylinker*, *String* e *Genemania* (2016).

A análise do exoma dos indivíduos P.M. (IV-19) e D.H. (IV-13) compreendeu 136 genes, dentre os quais 68 apresentaram um total de 142 variantes sendo as mais frequentes do tipo sinônimas (66%) e não sinônimas (31%). Estas variantes estão representadas nas Tabelas 14, 15 e 16. Ao analisar comparativamente tais exomas foram encontradas 79 variantes, em 42 genes, comuns aos indivíduos estudados, 33 variantes, em 24 genes, exclusivas em P.M. (TABELA 15) e 27 variantes, em 19 genes, exclusivas em D. H. (TABELA 16). Analisando as variantes exclusivas para cada um dos indivíduos, destacamos a presença de variantes no gene *A2ML1* são relatadas em alguns casos de Síndrome de Noonan (VISSERS et al., 2015; AOKI et al., 2016) e os genes *CCM2*, *RSP6KA1* e *SMARCA4*. Além das variantes no gene *A2ML1*, foram encontradas variantes em outros genes já relacionados com às Rasopatias, grupo de doenças no qual está inserido a Neurofibromatose 1. Na maioria, as variantes identificadas eram sinônimas como rs2229869 (*SOS2*), rs13054014 (*LZTR1*) em P.M., e rs9648696 (*BRAF*), rs12628 (*HRAS*), rs10250 (*MAP2K2*), rs7182445 e rs3751526 (*SPRED1*) em ambos os indivíduos. Entre as variantes não sinônimas encontradas em genes relacionados às Rasopatias destacamos, além de *A2ML1*, a rs 493446 no gene *RIT1* em ambos os indivíduos.



TABELA 14 - VARIANTES IDENTIFICADAS EM 42 GENES EM P.M. (IV-19) E D.H. (IV-13)

Gene	Cromossomo	Exon	rs	Frequência na população européia (%)	Tipo	Genótipo P.M/D.H	NM	Variante
<i>A2ML1</i>	12	20	1860926	0 (C)	Não sinônima	AA/AA	NM_144670	c.C2550A, p.D850E
		26	11612600	36 (A)	Sinônima	AG/AG	NM_144670	c.G3237A, p.V1079V
		29	10219561	0 (A)	Não sinônima	GG/GG	NM_144670	c.A3686G, p.H1229R
		31	1476910	23 (A)	Sinônima	AG/AG	NM_144670	c.A4020G, p.Q1340Q
<i>AKT1</i>	14	10	1130233	24 (T)	Sinônima	TT/CT	NM_001014432	c.G726A, p.E242E
<i>ATM</i>	11	37	1801516	16 (A)	Não sinônima	AG/AG	NM_000051	c.G5557A, p.D1853N
		40	659243	0 (A)	Não sinônima	GG/GG	NM_000051	c.A5948G, p.N1983S
		47	Sem descrição	-	Não sinônima	AG/AG	NM_000051	c.A6908G, p.K2303R
<i>ATR</i>	3	4	2227928	0 (A)	Não sinônima	GG/GA	NM_001184	c.T632C, p.M211T
			2229033	1 (G)	Não sinônima	CG/CG	NM_001184	c.G891C, p.K297N
		30	2227931	39 (G)	Sinônima	AG/AG	NM_001184	c.T5208C, p.V1736V
		47	1802904	13 (C)	Sinônima	TT/TT	NM_001184	c.G7875A, p.Q2625Q
<i>BRAF</i>	7	16	9648696	15 (C)	Sinônima	CT/CT	NM_004333	c.A1929G, p.G643G
<i>BRCA1</i>	17	10	1799949	30 (A)	Sinônima	AA/AA	NM_007294	c.C2082T, p.S694S
			16940	35 (G)	Sinônima	AA/AA	NM_007294	c.T2311C, p.L771L
			799917	36 (A)	Não sinônima	AA/AA	NM_007294	c.C2612T, p.P971L
			16941	36 (C)	Não sinônima	CC/CC	NM_007294	c.A3113G, p.E1038G
			16942	35 (C)	Não sinônima	CC/CC	NM_007294	c.A3548G, p.K1183R
		12	1060915	36 (G)	Sinônima	GG/GG	NM_007294	c.T4308C, p.S1436S
		15	1799966	36 (C)	Não sinônima	CC/CC	NM_007294	c.A4837G, p.S1613G
<i>BRCA2</i>	13	11	206076	0 (G)	Sinônima	CC/CC	NM_000059	c.G6513C, p.V2171V
		14	169547	0 (T)	Não sinônima	CC/CC	NM_000059	c.T7397C, p.V2466A
<i>CCND1</i>	11	4	9344	50 (A)	Sinônima	AG/AG	NM_053056	c.G723A, p.P241P

<i>CHEK1</i>	11	13	506504	3 (A)	Não sinônima	GG/GG	NM_001114121	c.A1411G, p.I471V
<i>EGF</i>	4	19	4698803	20 (A)	Não sinônima	TT/AT	NM_001963	c.A2759T, p.E920V
<i>FOXA2</i>	20	2	1212275	13 (T)	Sinônima	CC/CC	NM_021784	c.A1206G, p.Q402Q
<i>GATA2</i>	3	2	1573858	34 (G)	Sinônima	CC/CC	NM_001145662	c.C15G, p.P5P
<i>GATA5</i>	20	5	4130580	16 (T)	Sinônima	GA	NM_080473	c.C609T, p.D203D
<i>GTF2B</i>	1	6	2794318	0 (G)	Sinônima	AA/AA	NM_001514	c.C724T, p.L242L
<i>HRAS</i>	11	2	12628	31 (G)	Sinônima	AG/AG	NM_001130442	c.T81C, p.H27H
<i>IL11</i>	19	2	1126757	47 (T)	Sinônima	CT/CT	NM_001267718	c.G9A, p.A3A
<i>IL13</i>	5	4	20541	21 (A)	Não sinônima	GG/GG	NM_002188	c.A431G, p.Q144R
<i>IL16</i>	15	9	4072111	10 (T)	Não sinônima	CT/CT	NM_172217	c.C1300T, p.P434S
		10	8031107	48 (A)	Sinônima	AA/AA	NM_172217	c.G1407A, c.Q469Q
		11	61752774	10 (T)	Sinônima	CT/CT	NM_172217	c.C1449T, p.H483H
		13	11073001	18 (G)	Sinônima	AG/AG	NM_172217	c.A3135G, p.T1045T
		18	4238526	0 (A)	Sinônima	GG/GG	NM_172217	c.A3855G, p.L1285L
<i>IL21</i>	4	3	4833837	34 (G)	Sinônima	AG/AA	NM_021803	c.C234T, p.C78C
<i>IL34</i>	16	5	8046424	47 (C)	Não sinônima	CC/CC	NM_001172771	c.G364C, p.E122Q
		7	4985556	10 (A)	Ganho <i>stop</i> códon	AC	NM_001172771	c.C636A, p.Y212X
<i>IL37</i>	2	2	3811046	30 (G)	Não sinônima	TT/TT	NM_014439	c.G92T, p.G31V
			3811047	30 (A)	Não sinônima	GG/GG	NM_014439	c.A124G, p.T42A
<i>INF2</i>	14	2	4983530	3 (C)	Sinônima	TT/TT	NM_001031714	c.C105T, p.P35P
		18	10133301	15 (T)	Sinônima	CT/CC	NM_001031714	c.T2640C, p.D880D
		21	1128840	15 (A)	Sinônima	AG/CC	NM_001031714	c.A3207G, p.P1069P
<i>LZTR1</i>	22	15	4822790	14 (T)	Sinônima	CT/CT	NM_006767	c.C1683T, p.R561R
<i>MMP11</i>	22	2	738792	7 (C)	Não sinônima	TT/CT	NM_002467	c.C113T, p.A38V

<i>MAP2K2</i>	19	6	10250	48 (T)	Sinônima	TT/TT	NM_030662	c.C660A, p.I220I
<i>MTOR</i>	1	10	1135172	28 (A)	Sinônima	GG/GG	NM_004958	c.T1437C, p.D479D
		19	1064261	28 (G)	Sinônima	AA/AA	NM_004958	c.C2997T, p.N999N
		33	1057079	26 (C)	Sinônima	TT/TT	NM_004958	c.G4731A, p.A1577A
<i>NF1</i>	17	7	1801052	28 (G)	Sinônima	AA/AA	NM_001042492	c.G702A, p.L234L
		25	Sem descrição	-	Deleção	-T/-T	NM_001042492	c.3218delT, p.M1073fs
<i>NOS1</i>	12	24	34375182	1 (T)	Sinônima	CT/CT	NM_001204218	c.G3624A, p.L1208L
<i>NOS2</i>	17	16	2297518	23 (A)	Não sinônima	AG/AA	NM_000625	c.C1823T, p.S608L
		20	1060822	39 (A)	Sinônima	GG/GG	NM_000625	c.T2358C, p.G786G
		22	1060826	38 (T)	Sinônima	CC/CC	NM_000625	c.A2757G, p.T919T
<i>POLR2A</i>	17	5	9898024	0 (T)	Sinônima	CC/CC	NM_000937	c.T592C, p.L198L
		6	2228128	27 (C)	Sinônima	CT/CT	NM_000937	c.T960C, p.N320N
		10	2228129	23 (T)	Sinônima	CC/CC	NM_000937	c.T1461C, p.S487S
		11	7217707	0 (T)	Sinônima	CC/CC	NM_000937	c.T1821C, p.S5607S
		14	2228130	4 (T)	Sinônima	CC/CC	NM_000937	c.T2292C, p.N764N
		29	9894023	0 (A)	Sinônima	GG/GG	NM_000937	c.A5100G, p.S1700S
<i>PDGFD</i>	11	7	10791649	45 (G)	Sinônima	AG/GG	NM_025208	c.T1080C, p.C360C
<i>RIT1</i>	1	2	493446	11 (C)	Não sinônima	GG/GG	NM_001256821	c.G31C, p.E11Q
<i>RPS6KA1</i>	1	6	4970490	0 (T)	Sinônima	CC/CC	NM_001006665	c.T534C, p.A178A
<i>RRAS</i>	19	3	1865077	30 (G)	Sinônima	AA/AA	NM_006270	c.C333T, p.N111N
<i>SPRED1</i>	15	3	7182445	10 (G)	Sinônima	AA/AG	NM_152594	c.G291A, p.K97K
		7	3751526	10 (T)	Sinônima	CC/CT	NM_152594	c.T1044C, p.V348V
<i>TEK</i>	9	8	682632	3 (A)	Não sinônima	CC/CC	NM_000459	c.A1037C, p.Q346P
		13	639225	48 (G)	Sinônima	AG/AG	NM_000459	c.A1962G, p.S654S
		14	542913	25 (A)	Sinônima	AG/AG	NM_000459	c.G2322A, p.R774R
<i>TGFB3</i>	14	7	Sem descrição	-	-	CG/CG	NM_003239	-
<i>TIE1</i>	1	14	3120276	37 (T)	Sinônima	CT/CT	NM_001253357	c.T2199C, p.A733A

		18	1199039	38 (G)	Sinônima	AG/AG	NM_001253357	c.A2838G, p.L946L
<i>TIPIN</i>	15	3	9806123	0 (C)	Não sinônima	GG/GG	NM_017858	c.G158C, p.R53P
<i>TP53</i>	17	4	1042522	29 (G)	Não sinônima	CC/CG	NM_000546	c.C215G, p.P72R
<i>TPM1</i>	15	4	1071646	34 (C)	Sinônima	AC/AC	NM_001018005	c.C453A, p.A151A
<i>ZBTB42</i>	14	1	12878684	10 (A)	Sinônima	GG/AG	NM_001137601	c.A45G, p.R51R
			4983387	12 (G)	Não sinônima	AA/AG	NM_001137601	c.G694A, p.E232K

FONTE: Software IGV, Ensembl (2016).

TABELA 15 - VARIANTES IDENTIFICADAS EM 24 GENES EXCLUSIVAMENTE EM P.M. (IV-19).

Gene	Cromossomo	Exon	rs	Frequência na população europeia (%)	Tipo	Genótipo	NM	Variante
<i>A2ML1</i>	12	12	7308106	11 (G)	Sinônima	AG	NM_144670	c.A1275G, p.V425V
		19	1860927	16 (G)	Sinônima	AA	NM_144670	c.G2367A, p.P789P
		24	1558526	27 (A)	Não sinônima	AG	NM_144670	c.G2909A, p.C970Y
		28	1860967	39 (T)	Não sinônima	CT	NM_144670	c.C3364T, p.R1122W
		30	7308811	16 (A)	Não sinônima	GG	NM_144670	c.A3769G, p.M1257V
<i>ATR</i>	3	10	147895945	0 (G)	Sinônima	AG	NM_001184	c.T226C, p.C742C
<i>BRCA2</i>	13	11	1801406	28 (G)	Sinônima	AG	NM_000059	c.A3396G, p.K1132K
<i>CCM2</i>	7	6	2289367	21 (A)	Sinônima	AA	NM_001167934	c.G642A, p.T214T
<i>CSF3</i>	17	5	25645	37 (A)	Sinônima	AG	NM_172219	c.G546A, p.L182L
<i>EGF</i>	4	7	11568937	3 (C)	Sinônima	CG	NM_001963	c.T1095C, p.H365H
		14	2237051	36 (A)	Não sinônima	AG	NM_001963	c.G2124A, p.M708I
<i>ENG</i>	9	2	11545664	10 (T)	Sinônima	CT	NM_000118	c.G207A, p.L69L
<i>FLT4</i>	5	19	448012	35 (G)	Não sinônima	CC	NM_0020202	c.C2670G, p.H890Q
<i>GATA2</i>	3	3	2335052	18 (T)	Não sinônima	CT	NM_001145662	c.G490A, p.A164T
<i>GATA5</i>	20	5	6587239	46 (T)	Sinônima	CT	NM_080473	c.G852A, p.K284K
<i>GRIN1</i>	9	5	6293	34 (G)	Sinônima	AG	NM_000832	c.A789G, p.P263P
		6	1126442	34 (A)	Sinônima	AG	NM_000832	c.G855A, p.V285V
<i>IL2</i>	4	1	2069763	34 (A)	Sinônima	AC	NM_000586	c.G114T, p.L38L
<i>IL3</i>	5	1	40401	25 (T)	Não sinônima	CT	NM_000588	c.C79T, p.P27S

<i>INF2</i>	14	21	34251364	8 (T)	Não sinônima	CT	NM_001031714	c.C3286T, p.P1096S
<i>LZTR1</i>	22	2	13054014	26 (A)	Sinônima	AG	NM_006767	c.G210A, p.K70K
<i>NOS1</i>	12	17	11068428	32 (A)	Não sinônima	AG	NM_001204218	c.C2557T, p.P853S
		19	1047735	32 (A)	Sinônima	AG	NM_001204218	c.C2808T, p.H936H
		23	3741475	21 (A)	Sinônima	AG	NM_001204218	c.C3360T, p.D1120D
<i>PDGFA</i>	7	3	1129401	25 (G)	Sinônima	AG	NM_002607	c.T207C, p.H69H
<i>RPS6KA1</i>	1	15	10644196	-	Sinônima	CT	NM_001006665	c.T1425C, p.Y475Y
<i>SAMD11</i>	1	7	568340123	-	Deleção	-	NM_152486	c.645_692del, p.215_231del
						CCTCCCCA GCCACGGT GAGGACCC ACCCTGGC ATGATCCC CCTCATCA		
<i>SDC2</i>	8	2	1126681	22 (T)	Sinônima	CT	NM_002998	c.C153T, p.Y51Y
<i>SOS2</i>	14	14	2229869	33 (G)	Sinônima	AG	NM_006939	c.C2232T, p.N744N
<i>TEK</i>	9	21	2273719	13 (A)	Sinônima	AG	NM_000459	c.G3123A, p.G1041G
<i>TIMP1</i>	X	5	4898	46 (C)	Sinônima	CT	NM_003254	c.T372C, p.F124F
<i>TIMP2</i>	17	1	111654265	10 (A)	Sinônima	AC	NM_003255	-
<i>TIMP3</i>	22	3	9862	48 (C)	Sinônima	CC	NM_000362	c.T249C, p.H83H
<i>ZBTB42</i>	14	1	34284721	11 (A)	Não sinônima	AG	NM_001137601	c.G400A, p.A134T
			10141867	27 (A)	Sinônima	AG	NM_001137601	c.G570A, p.L190L

FONTE: Software IGV, Ensembl (2016).

TABELA 16 - VARIANTES IDENTIFICADAS EM 19 GENES EXCLUSIVAMENTE EM D.H. (IV-13).

Gene	Cromossomo	Exon	rs	Frequência na população européia (%)	Tipo	Genótipo	NM	Variante
<i>A2ML1</i>	12	22	200462659	0 (C)	Sinônima	CT	NM_144670	c.T2749C, p.L917L
		24	56179521	6 (T)	Sinônima	CT	NM_144670	c.C2868T, p.A956A
		29	73040625	7 (T)	Não sinônima	CT	NM_144670	c.C3569T, p.A1190V
		30	61749073	8 (C)	Sinônima	CT	NM_144670	c.T3843C, p.V1281V
<i>BRCA2</i>	13	11	543304	20 (C)	Sinônima	CT	NM_000059	c.T3807C, p.V1269V
<i>CCM2</i>	7	3	11552377	17 (A)	Não sinônima	CG	NM_001167934	c.G184A, p.V62I
<i>FLT4</i>	5	10	3736062	3 (A)	Sinônima	AG	NM_0020202	c.C1344T, p.Y448Y
		23	1130378	28 (A)	Sinônima	AG	NM_0020202	c.C3198T, p.P1066P
<i>IL19</i>	1	7	2243191	23 (T)	Não sinônima	AT	NM_013371	c.T524C, p.F175S
<i>IL25</i>	14	2	79877597	1 (T)	Sinônima	AC	NM_022789	c.C424A, p.R142R
<i>IL27</i>	16	4	181206	29 (G)	Não sinônima	AG	NM_145659	c.T356C, p.L119P
<i>IL31</i>	12	3	7074857	0 (A)	Sinônima	CG	NM_001014336	c.C183G, p.G61G
<i>INF2</i>	14	21	4983535	23 (T)	Sinônima	CC	NM_000362	c.T3066C, p.D1022D
<i>MMP11</i>	22	2	28363648	1 (C)	Não sinônima	CT	NM_005940	c.G591A, p.S86P
		8	28382575	1 (C)	Sinônima	CT	NM_005940	c.T1425C, p.P475P
<i>MYC</i>	8	2	4645959	5 (G)	Não sinônima	AG	NM_002467	c.A77G, p.N26S
<i>NOS1</i>	12	13	2293054	31 (A)	Sinônima	GG	NM_001204218	c.T2202C, p.I734I
<i>NOS2</i>	17	10	1137933	24 (A)	Sinônima	AG	NM_000625	c.C1155T, p.D385D
<i>PTPN14</i>	1	11	7550799	23 (T)	Sinônima	GA	NM_005401	c.A978G, p.R326R
		17	1135352	22 (T)	Sinônima	CT	NM_005401	c.A325G, p.E1084E

<i>RPS6KA1</i>	1	12	2229712	19 (C)	Não sinônima	AC	NM_001006665	c.A1031C, p.K344T
<i>SAMD11</i>	1	14	142832714	0 (T)	Sinônima	GT	NM_152486	c.G1935T, p.T645T
<i>SMARCA4</i>	19	5	140192268	2 (C)	Não sinônima	CT	NM_001128845	c.T1114C, p.Y372H
		8	7935	35 (T)	Sinônima	CT	NM_001128845	c.T1524C, p.H508H
		27	28997582	7 (T)	Sinônima	CT	NM_001128845	c.C3954T, p.D1318D
<i>SMARCC1</i>	3	19	1141601	32 (C)	Sinônima	CC	NM_003074	c.A1845G, p.K615K
<i>TIRAP</i>	11	5	7932766	22 (T)	Sinônima	TT	NM_001039661	c.C558T, p.A186A

FONTE: Software IGV, Ensembl (2016).



## 7. DISCUSSÃO

### 7.1 Famílias Menonitas com histórico de câncer

A partir do histórico reunido e cálculos realizados, verificou-se que não havia indicativos de uma história de câncer hereditário para as famílias Wit 01, 03, 05, 06, 07 e 10. As informações reunidas sobre os tipos e número de casos de câncer e as idades de aparecimento nestas famílias não são suficientes para dizer que os probandos e seus familiares apresentem um maior risco para alguma das formas hereditárias dos tipos de câncer analisados. Os cálculos de risco para cânceres hereditários tais como os de mama, ovário, colorretal, endométrio e melanoma estão na mesma proporção dos cálculos empíricos da população em geral e a probabilidade de mutações nos genes relacionados a estes tipos de câncer mostraram-se na maioria desprezíveis. Sendo assim, não havia indicação formal para realizar uma investigação genética adicional nestas famílias.

Nas famílias em que os probandos possuíam diagnóstico prévio de câncer de mama (Wit01 e 03) recomendou-se a estas mulheres e a seus familiares a continuidade das medidas para detecção precoce do câncer como o autoexame das mamas a cada mês, exame preventivo do câncer de colo de útero e a realização de mamografia anualmente conjuntamente com a introdução ou manutenção em sua rotina de exercícios físicos ao menos por quatro horas semanais e dieta rica em fibras com baixa quantidade de gorduras animais, já que estes são fatores reconhecidamente protetores para ocorrência de câncer de mama. Além disso, evitar exposição desnecessária a hormônios, principalmente estrógeno, o que pode aumentar o risco para câncer de mama.

A maioria das famílias analisadas exhibe evidências da ocorrência de casos esporádicos de câncer, onde mutações somáticas em genes importantes (oncogenes e supressores de tumor) permitem seu desenvolvimento, uma vez que as idades de diagnósticos são mais elevadas. Casos de câncer familiar caracterizam-se pela recorrência familiar de algumas formas comuns de câncer acima do esperado, identificando-se características multifatoriais. Neste caso a existência de fatores de risco que conferem uma maior suscetibilidade ao

desenvolvimento de alguns tipos de câncer e exposição a um mesmo fator ambiental, pode ser observada. A origem europeia, principalmente alemã-holandesa, dos habitantes da Colônia de Witmarsum lhes confere pele clara, fato que aliado ao trabalho, por exemplo, na lavoura pode aumentar a ocorrência de câncer de pele.

A partir da análise destas famílias fica evidente a importância do conhecimento da história familiar para o aconselhamento genético. Observou-se em diversos momentos que as famílias careciam de informações precisas, principalmente com relação ao tipo de tumor diagnosticado para algum parente e a idade deste diagnóstico. Deste modo, cerca de 21,5% dos casos de tumores relatados não apresentavam informações suficientes para serem classificados. O conhecimento destas informações é importante para a análise de risco de desenvolvimento de câncer para os indivíduos da família, uma vez que dependendo do número de casos e idades de diagnóstico este cálculo pode ser alterado. Solomon e colaboradores (2016) avaliaram a importância da história familiar no encaminhamento correto de indivíduos para *screening* de câncer de mama/ovário e cólon. Concluíram que uma proporção significativa de indivíduos candidatos ao *screening* e ao aconselhamento genético seria excluída se a história familiar se limitasse apenas aos parentes em primeiro grau. Desta forma, devido à escassez de informações, alguma evidência de presença de fatores hereditários pode não ter sido identificada e induzido o diagnóstico de câncer esporádico ou familiar.

Assim, foi recomendado além da adoção de hábitos saudáveis como a incorporação de uma boa alimentação e prática de exercícios físicos, procurar pesquisar o histórico médico da respectiva família, procurando reunir a maior quantidade de informações e, em caso de novas informações, o contato da Professora Doutora Enilze M. S. F. Ribeiro foi disponibilizado para solicitar uma nova realização dos cálculos de risco para o desenvolvimento de câncer.

As demais três famílias Menonitas analisadas exibiram características de alguma síndrome de câncer hereditária e serão discutidas separadamente.

Um aspecto de grande relevância, é que o número de famílias analisadas neste estudo não pode ser visto como representativo da Comunidade Menonita de Witmarsum (PR), que conta com cerca de 342 famílias (1200 indivíduos).

Desta forma, não foi possível calcular a prevalência de câncer (seja esporádico ou hereditário) nesta comunidade.

## 7.2 Síndrome de Câncer de Mama e Ovário Hereditários (HBOC)

As famílias Wit 04 e 09 apresentaram características sugestivas de uma predisposição hereditária ao câncer de mama, a Síndrome de Câncer de Mama e Ovário Hereditários (HBOC). Esta síndrome está relacionada com o aumento da predisposição ao desenvolvimento de câncer de mama, ovário ou ambos exibindo herança autossômica dominante. É caracterizada em famílias que apresentam indivíduos diagnosticados em idade precoce (<50 anos de idade); parentes de primeiro e/ou segundo grau afetados; parentes afetados em duas gerações sucessivas; casos de câncer de mama bilateral e em homens, história familiar de câncer de ovário. Tais condições aumentam a suscetibilidade de desenvolvimento de câncer uma vez que há mutações, em genes relacionados a estes tipos de câncer, presentes na linhagem germinativa parental. Tal ocorrência permite a existência de transmissão vertical além de associações com aumento do risco de desenvolvimento de outros tipos de tumores como próstata, estômago, colorretal, pâncreas e leucemias (FORD *et al.*, 1994; PHAROAH *et al.*, 1997; VAN ASPEREN *et al.*, 2005; FRIEDENSON, 2007; IQBAL *et al.*, 2012; MORAN *et al.*, 2011; MERSCH *et al.*, 2014; PHELAN *et al.*, 2013).

Menos de 10% dos pacientes com câncer de mama e cerca de 5% dos casos de câncer de ovário exibem mutação hereditária, porém a incidência entre indivíduos que apresentam histórico familiar de câncer de mama e/ou ovário é alta (FOULKES, 2008; DALY *et al.*, 2010; SILVA; CASALI-DA-COSTA, 2015). Estima-se que a prevalência de portadores de mutações nos genes *BRCA1/2* na população geral seja de 0,11% e 0,12% respectivamente, enquanto que entre indivíduos que têm história familiar com três ou mais casos de câncer de mama e/ou ovário aumenta para 12,8% e 16%, respectivamente (AMENDOLA; VIEIRA, 2005). Mutações herdadas nos genes *BRCA1/2* são consideradas as principais responsáveis pela predisposição à HBOC, sendo identificadas em cerca de 30-40% dos casos (SKOLNICK, 1994; WOOSTER *et al.*, 1995, KING *et al.*, 2003; COUCH *et al.*, 2014). Contudo, análises moleculares têm apontado uma diversidade de outros genes que podem estar relacionados ao aumento da

suscetibilidade ao câncer de mama e ovário hereditário como, por exemplo, *PTEN*, *TP53*, *PALB2*, *CHEK2*, *STK11*, *ATM* e *CDH1* (WALSH; KING, 2007; KOBAYASHI *et al.*, 2013; COUCH *et al.*, 2014; ECONOMOPOULOU *et al.*, 2015; HIROTSU *et al.*, 2015; YANG *et al.*, 2016). O desenvolvimento de técnicas mais sensíveis como o Sequenciamento de Nova Geração (NSG) possibilita a análise simultânea de diversos genes de interesse. Deste modo, cada vez mais variantes em diferentes genes têm sido relacionadas com o aumento de risco no desenvolvimento de câncer em portadores de HBOC auxiliando na compreensão das causas da doença e no prognóstico (COUCH *et al.* 2014; CYBULSKI *et al.* 2014; KURIAN *et al.* 2014; LADUCA *et al.* 2014; TUNG *et al.*, 2015).

O gene *BRCA1* está localizado no braço longo do cromossomo 17 (17q21) e o *BRCA2* no braço longo do cromossomo 13 (13q12.3), são considerados supressores de tumor e atuam principalmente no reparo de dano de dupla fita no DNA e, conseqüentemente, na manutenção da integridade genômica. Entre os portadores de alterações em *BRCA1* o risco em desenvolver câncer de mama, até os 80 anos de idade, é cerca de 80% e de ovário é 45%. Para portadores de alterações em *BRCA2*, os riscos são 66% e 12%, respectivamente (WELCSH; KING, 2001; HARTMANN; LINDOR, 2016). Além disso, após um câncer de mama primário, indivíduos com mutações nestes genes exibem maior risco de desenvolver câncer na mama contralateral (GRAESER *et al.*, 2009; HERTMANN; LINDOR, 2016).

Avaliamos que a probabilidade do probando da família Wit 04 ser portador de mutação em um dos genes *BRCA* é da ordem de 48,3%. Para o probando da família Wit 09 a probabilidade calculada foi de 20%. A partir de tais resultados, ambas as famílias foram convidadas a investigar possíveis alterações nestes genes, o que foi aceito apenas pela família Wit 9.

A análise foi realizada no indivíduo III-3 da família Wit 09 e revelou a existência da mutação c.1961delA (rs80357522) que acarreta na alteração do quadro de leitura (p.K645Sfs) prejudicando a formação dos domínios de interação BRCT 1/2 e de regiões que formam ligações covalentes com outras proteínas ou entre partes da própria *BRCA1* promovendo a formação de uma proteína truncada. Esta variante foi observada de forma recorrente em casos de câncer de mama e ovário familiar registrados em bancos de dados públicos como o BIC (*Breast Cancer Information Core – NIH*). Esta mutação também aparece

como recorrente em publicação do “Programa de Aconselhamento Genético em Câncer da Comunidade Valenciana, na Espanha” (JIMÉNEZ *et al.*, 2013), cuja análise corrobora com o caso aqui descrito. A relação genótipo/fenótipo é ainda um desafio e neste trabalho os autores dividem os pacientes em diferentes grupos fenotípicos na tentativa de descrever estas correlações. Devido à baixa idade no diagnóstico (28 anos), nossa paciente se encaixa no grupo fenotípico 1 (BC<30 anos) que apresenta maior ocorrência de recidivas, câncer bilateral e de metástases à distância (após a primeira entrevista, a paciente desenvolveu metástases ósseas aos 36 anos). Consideramos, portanto, que esta mutação é responsável pelo desenvolvimento do tumor mamário relatado por este indivíduo. Entretanto, notamos que esta família não exhibe as características típicas da maioria das famílias *BRCA1* positivas, em especial a histopatologia do tumor apresentada pelo probando, com positividade para os receptores de estrogênio e progesterona e amplificação do oncogene *HER2*. Tumores *BRCA1* positivos, em geral, apresentam-se como triplo negativos, ou seja, negativos para estes três marcadores. Além disto, notamos, até o momento, a não manifestação do fenótipo pela mãe da paciente, que deve ser portadora e transmissora da mutação. Esta manifestou quadro de múltiplos cânceres de pele, uma manifestação não usual entre os portadores de mutação em *BRCA1*. Com o objetivo de explorar possíveis variantes que possam estar influenciando na expressividade e na penetrância, a partir da análise do exoma, descrevemos outras variantes (Tabela 11, página 63). Cada uma delas deve ser posteriormente estudada de forma mais aprofundada, porém podemos aqui destacar duas mutações do tipo *frameshift*: uma no gene *BLM* e outra no gene *RB1*.

O gene *BLM* atua nos processos de replicação e reparo do DNA através da interação com *BRCA1* e outras proteínas, formando o complexo de vigilância do genoma associado à proteína *BRCA1* (complexo BASC). Este gene foi, recentemente, relacionado com o câncer de mama hereditário e mutações em *BRCA1* e *BLM* já foram relatadas conjuntamente em casos de câncer de mama (heterozigose combinada) (WANG *et al.*, 2000; SOKOLENKO *et al.*, 2014; SUSPITSIN *et al.*, 2014). A existência de mutação em outro gene além de *BRCA1* são relatadas em portadores de câncer de mama e contribuem para o aumento da probabilidade de desenvolvimento desta doença. Portadores de

mutação no gene *BLM*, assim como em *CHEK2* e *NBS1*, podem exibir aumento da instabilidade genômica, fato que contribui com o desenvolvimento tumoral (THOMPSON *et al.*, 2012; PROKOFYEVA *et al.*, 2013; SOKOLENKO *et al.*, 2014; SUSPITSIN *et al.*, 2014). Assim o gene *BLM* tem se mostrado importante na susceptibilidade genética ao câncer de mama relacionado à via ATM-CHEK2-BRCA1.

O gene *RB1* codifica um supressor de tumor, que age sobre o ciclo celular. A estimulação mitogênica leva as quinases dependentes de ciclinas (CDKs) a iniciarem uma cascata de fosforilação promovendo a inativação de RB1. Deste modo, o fator de transcrição E2F é liberado e leva à transcrição de genes envolvidos na progressão, síntese e replicação do DNA, diferenciação e sobrevivência. Em contrapartida, a forma hipofosforilada (ativa) de RB1 interage com o E2F inibindo-o e, assim, reprimindo a transcrição dos genes relatados acima induzindo a parada do ciclo celular para o reparo de possíveis danos no DNA (WEINBERG, 1995; COBRINIK, 2005; HENLEY; DICK, 2012; SAGE, 2012; JOHNSON, *et al.*, 2016). Mutações neste gene vem sendo descritas em diversos tipos de câncer, como em casos de retinoblastoma e na progressão do câncer de mama (LOHMANN, 1999; BLAQUET *et al.*, 1994; JIANG *et al.*, 2011). Em linhagem celular de câncer da mama com RB1 inativo, observou-se a expressão de genes envolvidos com a transição epitelial-mesenquimal (ARIMA *et al.*, 2012; JOHNSON, *et al.*, 2016). Assim, a perda da função de RB1 mostra-se um importante evento para a iniciação e progressão do câncer por meio da via CDK-RB-E2F.

As variantes encontradas em *BLM* e *RB1* no indivíduo III-3 da família Wit 09 promovem a produção de proteínas BLM e RB1 truncadas e, provavelmente, ineficientes. Deste modo, podem ter contribuído para o desenvolvimento do câncer de mama, assim como com o processo de metástase.

Identificar as famílias de risco é fundamental para garantir o desenvolvimento e a implementação de estratégias para identificação e diagnóstico precoce, escolha de estratégias terapêuticas e ações preventivas. Neste exemplo da família Wit 09, vemos claramente que, se este diagnóstico de mutação no gene *BRCA1* tivesse sido realizado em tempo hábil, o probando poderia ter se beneficiado de medidas profiláticas e de um tratamento mais direcionado e, neste momento, poderia apresentar um melhor curso da doença.

Assim, o exercício do aconselhamento genético, propicia o conhecimento do risco de desenvolvimento de câncer, a possibilidade de realização de testes genéticos, de rastreamento e vigilância do tumor, além da realização de cirurgias para redução de risco como a mastectomia e a salpingooforectomia nos casos de câncer de mama e ovário, e/ou a realização de quimioprevenção (ESTEVES *et al.*, 2009; AGARWAL *et al.*, 2014), beneficiando pacientes e familiares.

### 7.3 Neurofibromatose do Tipo 1

A Neurofibromatose do Tipo 1 (OMIM#162200), também conhecida como Síndrome de von Recklinghausen, é uma doença autossômica dominante causada pela ocorrência de mutações no gene *NF1* (OMIM 613113), com incidência de 1 em 3000-4000 indivíduos (CROWE *et al.*, 1956; RICCARDI; EICHNER, 1986; STUMPF *et al.*, 1987; TROVÓ-MARQUI; TAJARA, 2006). As principais características clínicas englobam neurofibromas, manchas na pele de cor café-com-leite, nódulos de Lisch (elevações arredondadas presentes na íris podendo ser transparentes ou variar a coloração do amarelo ao marrom sem acarretar problemas oftalmológicos), deformidades ósseas, baixa estatura, problemas de aprendizagem, macrocefalia e predisposição ao desenvolvimento de neoplasias como leucemias mielóides, gliomas e feocromocitomas, (BADER; 1986; RICCARDI; EICHNER, 1986; HUSON; HUGHES, 1994, LYNCH; GUTMANN, 2002).

O gene *NF1* está localizado na região cromossômica 17q11.2 (BARKER *et al.*, 1987), possui 60 éxons e codifica a proteína citoplasmática Neurofibromina (NF1) que exibe diferentes funções em diversas vias de sinalização celular, principalmente, como regulador negativo da proteína RAS. A proteína NF1 é expressa, principalmente, em neurônios, oligodendrócitos, células de Schwann, astrócitos e leucócitos atuando como supressor de tumor e auxiliando no controle do crescimento e divisão desordenados (GUTMANN; WOOD; COLLINS, 1991; DECLUE; COHEN; LOWY, 1991; DASTON *et al.*, 1992). Mutações neste gene são relacionadas, além da Neurofibromatose do tipo 1, também com a leucemia mielomonocítica juvenil e Síndrome de Watson (síndrome com características semelhantes à Neurofibromatose como neurofibromas, manchas café-com-leite, nódulos de Lisch, sardas, estenose pulmonar, baixa estatura, macrocefalia)

(GUTMANN; WOOD; COLLINS, 1991; DECLUE; COHEN; LOWY, 1991; DASTON *et al.*, 1992, RODRIGUES *et al.*, 2014).

A família Menonita Wit 02 é portadora da Neurofibromatose do Tipo 1, como foi relatado por alguns de seus integrantes que já tinham conhecimento deste diagnóstico clínico. A maioria dos indivíduos apresenta neurofibromas em diversas partes do corpo assim como manchas café-com-leite e alguns desenvolveram determinados tipos de tumores tanto malignos (como sarcoma) como benignos (astrocitoma e glioma). Portanto, diante do histórico familiar, foi analisada primeiramente a presença de variantes no gene *NF1*.

Mais de mil mutações em *NF1* relacionadas com a esta síndrome já foram descritas (MESSIAEN; WIMMER, 2008). Muitas destas resultam na produção de uma proteína truncada incapaz de desempenhar normalmente suas funções. Uma nova mutação foi encontrada nesta família, descrita como c.3601delT (p.1073fs) e que gera uma proteína truncada, conforme descrita em Resultados (Figura 23). Mutações de ponto que afetam a atividade RAS-GAP da neurofibromina ou a sua ligação à RAS têm sido relatadas em pacientes com a Neurofibromatose 1 indicando que a inativação desta atividade pode resultar nas manifestações clínicas desta doença (UPADHYAYA; COOPER, 1998).

A perda de um dos alelos selvagens de *NF1* pode ser observada em neoplasias associadas à Neurofibromatose do tipo 1. Zhu e colaboradores (2002) observaram que o estado de haploinsuficiência, quando há um alelo selvagem e outro mutado ou perdido, em tecido somático pode levar à criação de um microambiente favorável ao crescimento tumoral de neurofibromas, por exemplo. Portanto, parece que a existência de uma cópia mutada de *NF1* já é responsável pela observação de algumas manifestações clínicas desta doença desde que o alelo selvagem remanescente não conseguiria produzir a quantidade necessária de neurofibromina para gerar respostas biológicas corretas (TROVÓ-MARQUI *et al.*, 2006). Ao analisar integrantes da família Menonita Wit 02 observou-se que aqueles que possuem a mutação são heterozigotos apresentando, portanto, neurofibromina normal e truncada em suas células justificando o desenvolvimento de algumas condições observadas nestes indivíduos relacionadas à Neurofibromatose do tipo 1.

O gene *NF1* é caracterizado como um gene supressor de tumor e por isso seguiria a teoria dos dois eventos de Knudson (1971) necessitando uma segunda



mutação para tornar-se totalmente ineficiente. Tal fato já foi observado em feocromocitomas, leucemia mielóide e tumores da bainha dos nervos periféricos em pacientes com a Neurofibromatose (XU *et al.*, 1992; SHANNON *et al.*, 1994). No entanto a existência deste segundo evento em neurofibromas mostra-se controversa, podendo ocorrer em baixa frequência (COLMAN *et al.*, 1995; SAWADA *et al.*, 1996; SERRA *et al.*, 1997; JESSEN; MIRSKY, 1998; KLUWE *et al.*, 1999; RASMUSSEN *et al.*, 2000). Neste estudo, foram utilizadas amostras de sangue periférico (leucócitos) para análise de mutação em *NF1*. Deste modo, não foi possível averiguar se estes indivíduos apresentavam mutação no alelo selvagem nos tumores que desenvolveram. Deve-se ressaltar que, embora estudos demonstrem que o segundo evento de mutação pode ocorrer em neurofibromas, permanece o conceito de que tais mutações não sejam estritamente necessárias para o desenvolvimento do tumor benigno (CICHOWSKI; JACKS, 2001). Assim, integrantes desta família Menonita que exibem o alelo mutado de *NF1* apresentariam maiores chances de desenvolvimento de condições relacionada à Neurofibromatose do tipo 1, uma vez que já exibem uma deficiência de Neurofibromina que é integrante de vias ativadas por RAS.

A proteína *NF1* contém um domínio central RAS-GAP que atua como uma GTPase (BALLESTER *et al.*, 1990; MARTIN *et al.*, 1990; XU *et al.*, 1990). As proteínas GAP (proteínas ativadoras de GTPases) aceleram a hidrólise de GTP em GDP na proteína RAS tornando-a inativa. No entanto, sua atividade GTPase intrínseca é baixa, sendo aumentada devido a interações com outras proteínas como a *NF1* que permite o aumento de cerca de  $10^5$  vezes de sua taxa de hidrólise (DECLUE; COHEN; LOWY, 1991; TROVÓ-MARQUI; TAJARA, 2006). Estudos têm demonstrado que a perda da *NF1* em diversos tipos de tumores está relacionada com altos níveis da forma ativa de RAS (RAS-GTP) (BASU *et al.*, 1992; DECLUE *et al.*, 1992; GUHA *et al.*, 1996; FELDKAMP; ANGELOV; GUHA, 1999; LAU *et al.*, 2000; SHERMAN *et al.*, 2000). Em sua forma ativa, a proteína RAS interage com diversas outras proteínas, como a RAF que fosforila e ativa uma segunda proteína, a MEK que irá ativar membros da família ERK que, então, fosforila diversos alvos incluindo outras quinases como RKS e fatores de transcrição como o cAMP (adenosina monofosfato cíclica) em resposta à proteína CREB, importantes para o controle da expressão de genes envolvidos

com diferenciação, ciclo celular, migração e apoptose (FIGURA 28). Portanto, alterações na NF1 que reduza a taxa de inativação de RAS permite que esta mantenha-se ativa por mais tempo levando a uma longa estimulação da via de sinalização RAF-MEK-ERK promovendo a proliferação celular (WEISS; BOLLAG; SHANNON, 1999; TROVÓ-MARQUI; TAJARA, 2006). Além desta via, a RAS ativada pode levar à ativação contínua da via PI3K que por meio de fosforilações inativa o complexo TSC1-TSC2 e a consequente ativação de mTOR é importante para a regulação do ciclo celular e proliferação (PAN *et al.*, 2004; DASGUPTA *et al.*, 2005; JOHANNESSEN *et al.*, 2005). A NF1 também pode interagir com a adenilato ciclase, proteína presente na membrana plasmática responsável pela conversão de ATP em cAMP (FIGURA 28). A modulação da atividade desta proteína se dá pelo domínio rico em cisteína/serina da NF1, afetando vias de sinalização dependentes de cAMP, como da proteína PKA que estimula a expressão de genes relacionados à proliferação celular, ao tamanho corporal, ao processo de aprendizagem e de memória (IZAWA; TAMAKI; SAYA, 1996; DASGUPTA; GUGAN; GUTMANN, 2003). Outra associação observada é com os microtúbulos cuja região de interação estaria dentro do domínio relacionado à RAS (GREGORY *et al.*, 1993). Após sofrer fosforilação pela quinase MAP, a NF1 é capaz de se dissociar dos microtúbulos e sua associação com a tubulina pode reduzir sua habilidade de atuar como uma GAP (BOLLANG; MCCORMICK; CLARK, 1993) (FIGURA 28). Assim, por meio da indução do processo de ativação/inativação de RAS, um sinal de diferenciação é transmitido através de sua influência na organização dos microtúbulos. Sua perda poderia induzir a divisão celular contínua, possibilitando o desenvolvimento de tumores. Além disso, mutações que prejudicam sua interação com proteínas dos microtúbulos podem apresentar grande efeito em neurônios uma vez que este tipo celular apresenta grande concentração de microtúbulos especialmente nas projeções axonais e dendríticas, regiões importantes para a transmissão de sinal e a realização de conexões neuronais. Diante disso, é possível que alterações nas funções deste tipo celular resultem em problemas cognitivos e de aprendizagem, características observadas em alguns portadores da Neurofibromatose 1 (XU; GUTMANN, 1997; TROVÓ-MARQUI; TAJARA, 2006).

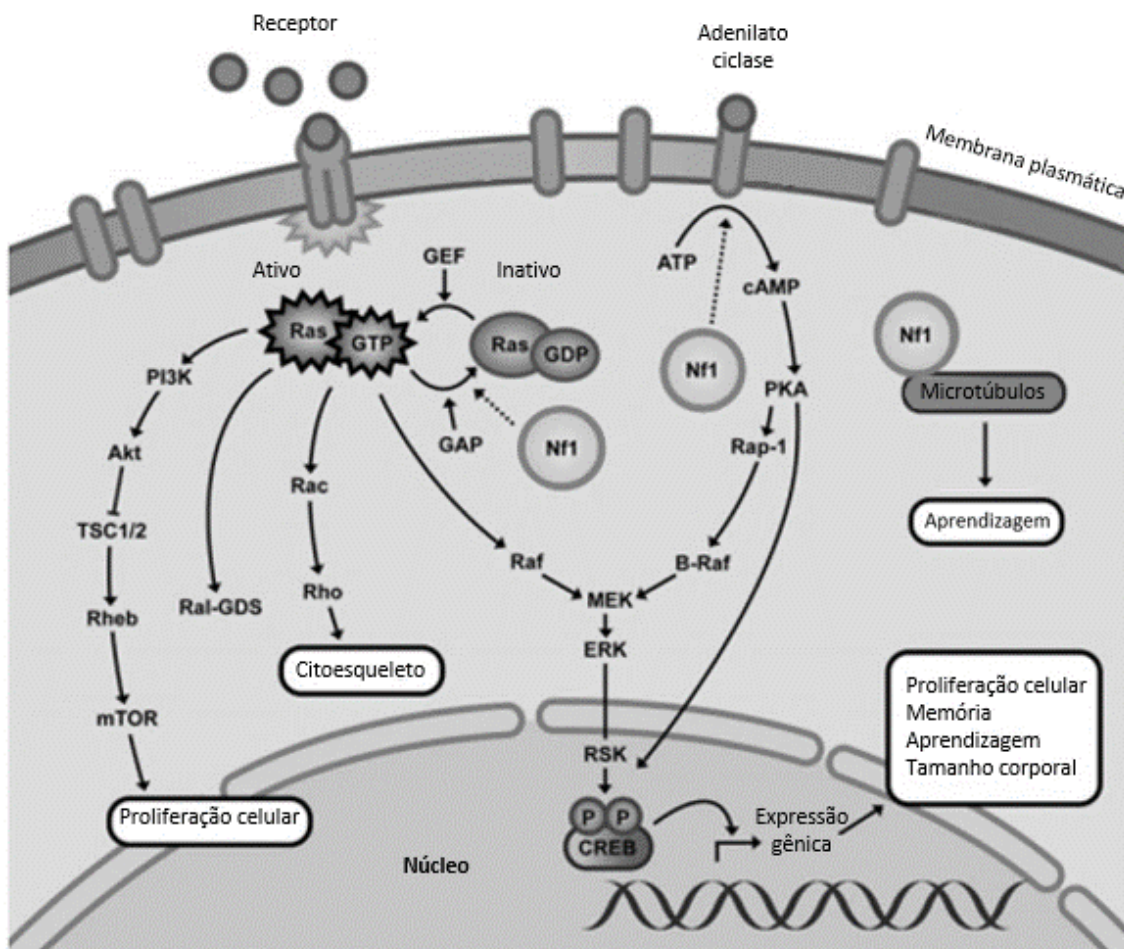


FIGURA 28 - INTERAÇÕES DA PROTEÍNA NF1 COM DIFERENTES VIAS DE SINALIZAÇÃO NAS CÉLULAS, INCLUINDO ATIVAÇÃO DE RAS, MODULAÇÃO DA GUANILATO CICLASE, ASSOCIAÇÃO COM MICROTÚBULOS E INTERAÇÃO COM DISTINTOS EFETORES.

FONTE: Adaptado de TROVÓ-MARQUI; TAJARA (2006).

Diante do múltiplo papel da neurofibromina na célula fica claro que mutações que alterem sua produção são capazes de direcionar ao desenvolvimento neoplásico, principalmente diante da redução da inativação da proteína RAS promovendo o aumento da transdução de sinal intracelular das cascatas ativadas por esta molécula. Deste modo as vias acionadas por RAS estariam ativas por mais tempo o que pode alterar os processos, principalmente, de proliferação e diferenciação celular, eventos importantes para o desenvolvimento de células tumorais que podem originar neurofibromas e demais tumores relacionados com o sistema nervoso central e periférico relatado em casos de Neurofibromatose do tipo 1, deste modo explicando as características encontradas nos integrantes desta família. Além disso, um

segundo evento de mutação no alelo selvagem de *NF1* pode ter acontecido e contribuído para o desenvolvimento de um sarcoma relatado por uma das integrantes desta família (indivíduo IV-18).

Estima-se que cerca de 40-50% dos casos de Neurofibromatose 1 exibem mutações *de novo* (BALLESTER *et al.*, 1990). Tal fato levou diversos estudos a se concentrarem na tentativa de estabelecer uma correlação genótipo-fenótipo para esta doença. Contudo, essa correlação ainda não se encontra bem definida sendo observada em apenas uma pequena parte dos indivíduos afetados, aqueles com grandes deleções em *NF1*. A dificuldade no estabelecimento desta correlação está relacionada com a observação de expressividade variável entre pacientes tanto com o mesmo tipo de mutação quanto diferentes (TROVÓ-MARQUI; TAJARA, 2006). Já foi observado que indivíduos portadores da Neurofibromatose 1 da mesma família podem exibir diferentes fenótipos com relação a percentagens e tipos de sintomas. As análises destes diferentes portadores e suas famílias sugerem a existência de um componente genético e efeitos poligênicos na variabilidade clínica encontrada notando-se traços de agregação familiar (EASTON *et al.*, 1993; SZUDEK *et al.*, 2000; PALMER *et al.*, 2004; SZUDEK; JOE; FRIEDMAN, 2004). Tal relação foi encontrada neste estudo onde os indivíduos afetados são portadores da mesma mutação, porém apresentam fenótipos bastante distintos. As mutações em *NF1* isoladamente parecem não serem capazes de explicar tal variabilidade fenotípica, por isso outros mecanismos têm sido propostos como genes modificadores, heterogeneidade alélica, *splicing* alternativo (que produz diferentes isoformas), mosaicismos somáticos, mutação no segundo alelo (dois eventos de Knudson), deleção de genes contíguos ao *NF1* assim como a influência de fatores ambientais (RICARDDI, 1992; DANGLLOT *et al.*, 1994, CICHOWSKI; JACKS, 2001 *apud* RICCARDDI, 1992; SZUDEK; JOE; FRIEDMAN, 2002). No entanto, os mecanismos subjacentes que podem explicar essa variabilidade clínica ainda não são bem compreendidos.

O gene *NF1* apresenta quatro éxons principais que sofrem *splicing* alternativo e que não alteram o quadro de leitura sendo eles 9a, 10a-2, 23a e 48a produzindo diferentes isoformas de neurofibromina como as isoformas II, 3, 4, 9a e 10a-2 (ANDERSEN *et al.*, 1993; GUTMANN *et al.*, 1993; DANGLLOT *et al.*, 1995; GUTMANN *et al.*, 1995; GUTMANN; ZHANG; HIRBE, 1999;

KAUFMANN *et al.*, 2002). A não inclusão dos éxons 4b, 29, 30, 33, 37, 43 e 45 no transcrito também vem sendo relatada (PARK *et al.*, 1998; ARS *et al.*, 2000; THOMSON; WALLACE, 2002; VANDENBROUCKE *et al.*, 2002). Além disso, cerca de 27% das mutações em *NF1* afetam o processo de *splicing* alternativo do pre-mRNA (MESSIAEN; WIMMER, 2008). As isoformas produzidas a partir deste processamento encontram-se expressas em diferentes níveis dependendo do tecido e isto pode estar relacionado com a variabilidade fenotípica encontrada entre os portadores desta condição (BERNARDS *et al.*, 1992; DANGLLOT *et al.*, 1994; GUTMANN; ZHANG; HIRBE, 1999; KAUFMANN *et al.*, 2002; VANDENBROUCKE *et al.*, 2002; BARRON; LOU, 2012; HINMAN *et al.*, 2014).

Poucos estudos têm avaliado o componente hereditário da expressão variável na Neurofibromatose do tipo 1 (EASTON *et al.*, 1993; SZUDEK; JOE; FRIEDMAN, 2002). Gêmeos monozigóticos portadores de Neurofibromatose do tipo 1 exibem diferentes fenótipos sugerindo o envolvimento de variantes somáticas em outros genes e influência epigenética nesta heterogeneidade fenotípica (RIELEY *et al.*, 2011). A avaliação de 12 características clínicas dessa doença em 750 portadores pertencentes a 275 famílias francesas demonstrou a existência de um forte componente genético para a maioria das características (SABBAGH *et al.*, 2009). Deste modo, há evidências da existência de um componente genético que atuaria na variabilidade fenotípica observada entre indivíduos não aparentados e aparentados, portadores desta condição. Um destes seriam os genes modificadores que podem estar agindo conjuntamente com o alelo alterado de *NF1*. Outros componentes genéticos que podem estar envolvidos nesta questão e se mostram aditivos seriam a atuação do alelo selvagem de *NF1* em indivíduos heterozigotos, a influência de outras variantes neste gene e a existência de modificação epigenética que de alguma maneira conseguem exercer certa influência contribuindo para a promoção da variabilidade fenotípica encontrada na Neurofibromatose do tipo 1 (CASTLE *et al.*, 2003; GÉNIN; FEINGOLD; CLERGET-DARPOUX, 2008; SABBAGH *et al.*, 2009; RIELEY *et al.*, 2011).

A partir da análise do exoma de dois indivíduos (P.M e D.H) da família Menonita Wit 2, procurou-se investigar a existência de variantes além de *NF1* que pudessem auxiliar na compreensão da diferença de fenótipo observada entre eles (P.M. com características de Síndrome de Noonan e D.H. com

distúrbios de angiogênese). Esta análise compreendeu 136 genes dos quais 68 apresentaram um total de 142 variantes. Procuramos observar as variantes comuns entre os dois indivíduos e as exclusivas, na tentativa de individualizar possíveis participantes na determinação dos diferentes fenótipos. Assim como já discutido para *BRCA1*, cada uma das variantes deve ser melhor estudada, porém algumas serão destacadas devido às suas funções relacionadas com os fenótipos observados e que se mostram interessantes alvos de estudos, como *A2ML1*, *CCM2*, *SMARCA4* e *RPS6KA1*.

O gene *A2ML1* codifica um inibidor de protease, a  $\alpha$ -2-macroglobulina-tipo-1, que pode interagir com a lipoproteína relacionada ao receptor de baixa densidade (LPR1) que parece interagir com a proteína CBL que, por sua vez, atua como regulador negativo de diversas vias de sinalização ativadas por receptores tirosina-quinase (FU *et al.*, 2003; GALLIANO *et al.*, 2006; AOKI *et al.*, 2016). Os genes *A2ML1* e *CBL* estão relacionados com as Rasopatias e mutações nestes já foram relatadas em alguns casos de Síndrome de Noonan (MARTINELLI *et al.*, 2010, NIEMEYER *et al.*, 2010, VISSERS *et al.*, 2015; TIDYMAN; RAUEN, 2016). Três variantes (rs1558526, rs1860967 e rs7308811) no gene *A2ML1* foram encontradas em P.M., sendo que em duas ocorre a troca de aminoácidos de propriedades físico-químicas similares (rs1558526 e rs7308811) e, provavelmente, não alteram a proteína. Já a variante rs186096 promove troca de uma arginina por um triptofano (p.R1122W), ou seja, um aminoácido polar básico para um apolar. Esta troca pode acarretar alteração na proteína que colaboraria com o fenótipo de Síndrome de Noonan exibido por P.M. No entanto, os mecanismos pelos quais *A2ML1* regula a via RAS/ERK ainda são desconhecidos.

O gene *CCM2* codifica uma proteína que possui um provável domínio de ligação à fosfotirosina e atua na ativação da via da sinalização p38-MAPK por meio de MEKK3 em resposta a estímulos extracelulares como estresse osmótico, físico e citocinas pró-inflamatórias (LIQUORI *et al.*, 2003; UHLIK *et al.*, 2003). Esta via leva à ativação de fatores de transcrição que atuam sobre a expressão de genes essenciais para a remodelação vascular (JACKSON *et al.*, 1998; TANAKA *et al.*, 1999; ISSBRUCKER *et al.*, 2003). Além disso, p38 atua como regulador negativo da sobrevivência, proliferação e diferenciação de células endoteliais e como mediador da ativação do fator de crescimento

endotelial vascular (VEGF) por meio de COX2 em células endoteliais durante a angiogênese (MATSUMOTO *et al.*, 2002; WU *et al.*, 2006). Portanto, a regulação da via p38-MAPK vem se mostrando um caminho para a modulação da angiogênese através de genes da família CCM. A variante encontrada em CCM2 (rs11552377) em D.H. promove a troca de aminoácidos com propriedades físico-químicas semelhantes (p.V62I) provavelmente não alterando a função da proteína CCM2, porém não se pode afirmar que não altere a via p38-MAPK, estimulando o processo de angiogênese e contribuindo com o desenvolvimento dos hemangiomas relatados. Além disso, a proteína mutante NF1 poderia estar colaborando com a proliferação e diferenciação das células endoteliais através da ativação da via RAS-MAPK.

O gene *RPS6KA1* codifica uma proteína da família RSK de quinases serina/treonina que fosforilam diversos substratos como as MAPKs atuando nos processos de crescimento, diferenciação, proliferação e sobrevivência celular. Esta proteína participa da via de sinalização de ERK, que promove a ação de fatores de transcrição como CREB e c-fos, e também realiza a fosforilação de quinases dependentes de ciclinas (CDKs), um inibidor de p27 e promotor da progressão da fase G1 do ciclo celular (CHEN; SARNECKI; BLENIS, 1992; FRODIN; GAMMELTOFT, 1999; ROUX; BLENIS, 2004; ANJUM; BLENIS, 2008). O gene *SMARCA4* codifica um coativador de transcrição que contribui com receptores hormonais nucleares potencializando a ativação da transcrição de diversos genes e compõe o complexo SWI/SNF que atua sobre a transcrição gênica por meio do remodelamento da cromatina por alteração da conformação dos nucleossomos (WANG *et al.*, 1996; TROTTER; ARCHER, 2008). Participa da via de sinalização Wnt que promove a proliferação, diferenciação, adesão e sobrevivência celular. Deste modo, estes poderiam estar atuando na transcrição de genes envolvidos, principalmente, com proliferação e diferenciação celular juntamente com a estimulação da via RAS-MAPK decorrente da mutação relatada em *NF1* também colaborando com o desenvolvimento do hemangioma relatado pelo indivíduo D.H., em quem foram encontradas variantes em ambos os genes (rs2229712, rs140192268).

Diante disto, uma análise funcional relativa a estas variantes pode contribuir na compreensão de suas funções na célula e sua provável contribuição

com as condições clínicas observadas nestes indivíduos, principalmente com o hemangioma de D.H.

A partir da avaliação das características clínicas do indivíduo P.M., suspeitou-se que este exibe uma apresentação clínica de Neurofibromatose do Tipo 1 com a Síndrome de Noonan (NFNS) (ALLANSON *et al.*, 1985). A maioria dos estudos sugerem que NFNS é uma variedade de Neurofibromatose do Tipo 1 uma vez que mutações no gene *NF1* são mais frequentemente observadas nestes pacientes e mutações no gene *PTPN11*, praticamente não foram encontradas nestes casos, além de que as características de Síndrome de Noonan (SN) são menos proeminentes (BARALLE *et al.*, 2003; DE LUCA *et al.*, 2005; NYSTRÖM *et al.*, 2009; THIEL *et al.*, 2009).

A Síndrome de Noonan apresenta fenótipo variável e distribuição semelhante entre os sexos com prevalência estimada entre 1/1000-2500 nascidos vivos (NOONAN, 1963; ALLANSON *et al.*, 1985). Em geral, indivíduos portadores de SN possuem particularidades faciais exibindo uma face mais triangular, implantação baixa e rotação incompleta do pavilhão auricular, hipertelorismo ocular, ptose palpebral, micrognatia e pescoço curto ou alado, além de baixa estatura, estenose pulmonar, atraso de desenvolvimento, alterações esqueléticas e linfáticas causadas principalmente por mutações no gene *PTPN11* e integrantes da família RAS (*HRAS*, *KRAS*, *NRAS*) (MALAQUIAS *et al.*, 2008)

Desde que foi relatada pela primeira vez a NFNS encontra-se no centro de um debate onde é questionado se esta condição seria uma síndrome distinta da Neurofibromatose do Tipo 1 e da Síndrome de Noonan, uma variabilidade fenotípica de qualquer uma destas duas condições ou se seria apenas uma coincidência delas (ALLANSON *et al.*, 1985; DELUCA *et al.*, 2005). Os portadores desta síndrome apresentam características de ambas as condições, porém alguns podem apresentar um fenótipo típico de Neurofibromatose 1 (ALLANSON *et al.*, 1985; KAPLAN; ROSENBLATT, 1985). Esta síndrome conjuntamente com a Neurofibromatose do Tipo 1 e a Síndrome de Noonan fazem parte das chamadas Rasopatias que reúne doenças clinicamente e geneticamente relacionadas causadas por mutações em genes que atuam na regulação da via de sinalização RAS-MAPK (FIGURA 29). A desregulação desta via por meio de alteração das proteínas que a compõe, como a encontrada em



*NF1* neste estudo, explicam a presença de características clínicas comuns às síndromes que compõem este grupo (Síndrome de Noonan, Síndrome de LEOPARD, Neurofibromatose do Tipo 1, Síndrome de Costello, Síndrome de Noonan associada à Neurofibromatose, Síndrome de Legius) (SCHUBBERT; SHANNON; BOLLANG, 2007; REIG *et al.*, 2011; ZENKER, 2011; EKVALL *et al.*, 2014) (FIGURA 29).

Diante desta semelhança fenotípica observada entre os portadores de Rasopatias procuramos analisar genes relacionados a estas, especialmente no indivíduo P.M. Além das variantes encontradas em *A2ML1* já mencionadas acima, foi observada uma variante não sinônima (rs493446) em *RIT1*. A proteína codificada por este gene está envolvida nas vias de sinalização p38-MAPK e RAS-MAPK. A *RIT1*, proteína semelhante à RAS (apresenta 50% de identidade), é expressa em muitos tecidos e é membro de um novo grupo de proteínas GTPases relacionadas com a família RAS (LEE *et al.*, 1996). Análises funcionais de mutações neste gene em células NIH3T3 evidenciaram um aumento da via de sinalização RAS/MAPK (AOKI *et al.*, 2013). Recentemente variantes em novos genes tem sido relacionadas com a Síndrome de Noonan, entre eles o *RIT1* (AOKI *et al.*, 2016;; CHEN *et al.*, 2014; TIDYMAN; RAUEN, 2016). Diversos estudos têm demonstrado a ocorrência de mutações neste gene em pacientes com a Síndrome de Noonan (BERTOLA *et al.*, 2014; CHEN *et al.*, 2014; GOS *et al.*, 2014). Aoki e colaboradores (2016) sugerem que a frequência de mutações em *RIT1* seja por volta de 5% em pacientes com a SN. Além disso, Chen e colaboradores (2014) ao analisar variantes em genes relacionado com SN identificaram dois indivíduos com mutações em *RIT1* e *NF1* que exibiam características de Neurofibromatose do tipo 1 concomitantemente com as de Síndrome de Noonan. Apesar da variante encontrada em *RIT1* neste estudo (rs493446) estar presente em ambos os indivíduos analisados, esta pode estar colaborando com o fenótipo exibido por P.M. O papel de *RIT1* vem sendo elucidado e uma análise funcional relativa a esta variante pode contribuir na compreensão de suas funções na célula assim como no fenótipo exibido por P.M.

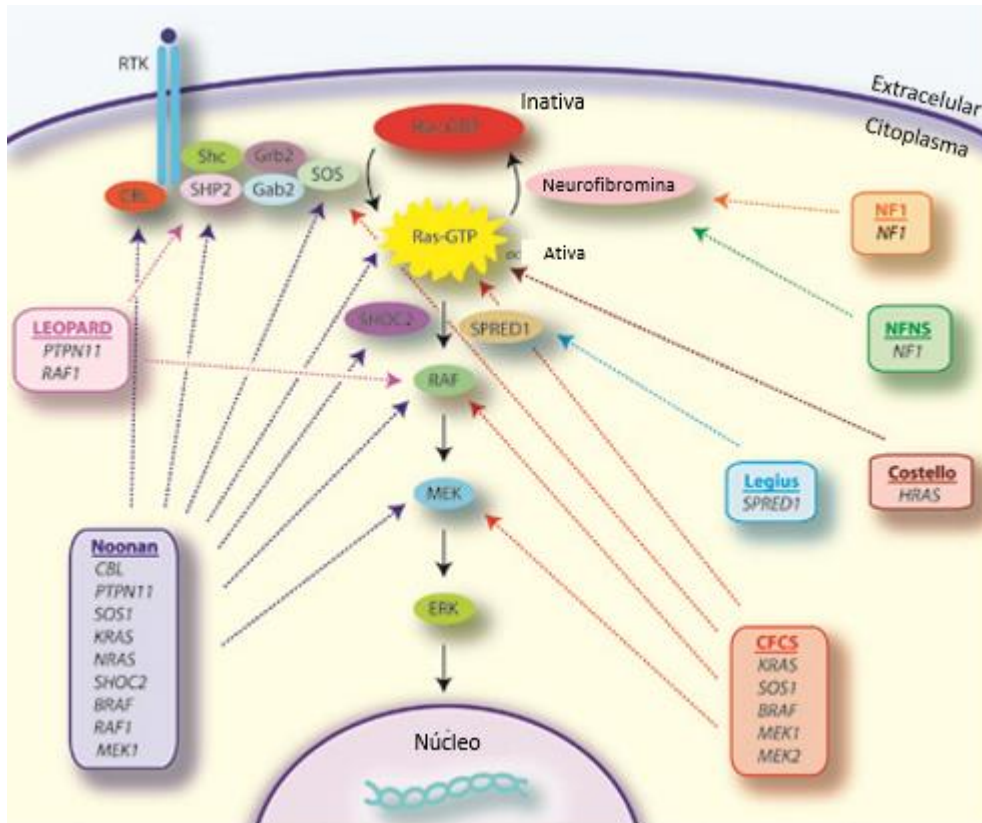


FIGURA 29 - VIA DE SINALIZAÇÃO RAS-MAPK E AS RASOPATIAS ASSOCIADAS COM A DESREGULAÇÃO DE VÁRIOS COMPONENTES DESTA VIA.

FONTE: Adaptado de EKVALL *et al.*, 2011.

## 8. CONCLUSÃO

- Entre as famílias analisadas (n=9), na maioria (n=6) não havia histórico compatível com câncer hereditário.
- O aconselhamento genético foi realizado em todas as famílias envolvidas, com os devidos cálculos de risco e processo educacional sobre o câncer, suas causas e prevenção.
- Foi identificada uma mutação já descrita no gene *BRCA1* e uma mutação não descrita no gene *NF1*. Em ambos os casos foi realizada análise de diversos genes com o objetivo de explorar a variabilidade fenotípica exibida nas duas famílias. Genes como *A2ML1*, *CCM2*, *SMARCA4*, *RIT1*, *RPS6KA1* e novas variantes foram destacadas e sugeridas como interessantes alvos para estudo.

## 9. PERSPECTIVAS

Diante da grande quantidade de dados gerados a partir da realização do sequenciamento de exoma de indivíduos portadores de Neurofibromatose do tipo 1 com diferentes fenótipos, este trabalho proporciona o desenvolvimento de linhas de estudo dentro desta condição genética. O mesmo se aplica ao exoma realizado em indivíduo portador de HBOC, cujo estudo mais aprofundado pode contribuir para uma correlação genótipo/fenótipo de extrema importância no aconselhamento genético. A atuação de genes moduladores parece colaborar com a penetrância e a expressividade variável destas doenças, porém quais são e seus mecanismos de ação ainda compõem um campo pouco conhecido e a ser explorado. Portanto, a partir dos dados que possuímos podemos elencar genes candidatos para serem melhor estudados através de ensaios funcionais. Além disso, uma análise minuciosa destes exomas podem demonstrar variantes novas em outros genes, como a encontrada em *NF1*, colaborando para a ampliação do conhecimento sobre alterações genéticas e suas consequências.

Dois artigos científicos se encontram em fase de redação, com os seguintes títulos provisórios: “Cancer Genetic Counseling in a Mennonite Community in South Brazil” e “Whole exome analysis in Neurofibromatosis type 1: a family report with a new *NF1* mutation and clinical variability”.

## REFERÊNCIAS

- AGARWAL, R.; LIEBE, S.; TURSKI, M. L.; VIDWANS, S. J.; JANKU, F.; GARRIDO-LAGUNA, I.; MUNOZ, J.; SCHWAB, R.; RODON, J.; KURZROCK, R.; SUBBIAH, V. *Target therapy for hereditary cancer syndromes: hereditary breast and ovarian cancer syndrome, Lynch syndrome, familial adenomatous polyposis and Li-Fraumeni syndrome. **Discovery Medicine***, v.18, n.101, p.331-339, 2014.
- AMENDOLA, L. C. B.; VIEIRA, R. A contribuição dos genes *BRCA* na predisposição hereditária ao câncer de mama. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.51, n.4, p.325-330. 2005.
- ALLANSON, J.; HALL, J. G.; VAN ALLEN, M. I. *Noonan phenotype associated with neurofibromatosis. **American Journal of Medical Genetics***, v.21, p. 457-462, 1985.
- ALMOMANI, R.; SUN, Y.; EMMELIEN ATEN, E.; HILHORST-HOFSTEE, Y.; PEETERS-SCHOLTE, C. M. P. C. D.; VAN HAERINGEN, A.; HENDROKS, Y. M. C.; DEN DUNNEN, J. T.; BREUNING, M. H.; KRIEK, M., SANTEN, G. W. E. *GPSM2 and Chudley–McCullough Syndrome: A Dutch Founder Variant Brought to North America. **American Journal of Medical Genetics Part A***, p.973-976, 2012.
- ALVARADO-ESQUIVEL, C.; DELANGHE, J. *Analysis of Haptoglobin Phenotype Polymorphism in a Mennonite Population of Northern Mexico. **Revista de Investigación Clínica***, v.59, n.6, p.491-492, 2007.
- AMENDOLA, L. C. B.; VIEIRA, R. A contribuição dos genes *BRCA* na predisposição hereditária ao câncer de mama. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.51, n.4, p.325-330, 2005.
- ANDERSEN, L. B.; BALLESTER, R.; MARCHUK, D. A.; CHANG, E.; GUTMANN, D. H.; SAULINO, A. M.; CAMONIS, J.; WIGLER, M.; COLLINS, F. S. *A conserved alternative splice in the von Recklinghausen neurofibromatosis (NF1) gene produces two neurofibromin isoforms, both of which have GTPase-activating protein activity. **Molecular and Cellular Biology***, v.13, p.487–495, 1993.
- ANJUM, R.; BLENIS, J. The RSK family of kinases: emerging roles in cellular signaling. **Molecular Cell Biology**, v. 9, p.747-758, 2008.
- ANTONIOU, A. C.; PHAROAH, P. D.; MCMULLAN, G.; DAY, N. E.; STRATTON, M. R.; PETO, J.; PONDER, B. J.; EASTON, D. F. *A comprehensive model for familial breast cancer incorporating BRCA1, BRCA2 and other genes. **British Journal of Cancer***, v.86, p.76-83, 2002.
- ANTONIOU, A. C.; PHAROAH, P. P.; SMITH, P.; EASTON, D. F. *The BOADICEA model of genetic susceptibility to breast and ovarian cancer. **British Journal of Cancer***, v.91, p.1580-1590, 2004.
- AOKI, Y.; NIIHORI, T.; BANJO, T.; OKAMOTO, N.; MIZUNO, S.; KUROSAWA, K.; OGATA, T.; TAKADA, F.; YANO, M.; ANDO, T.; HOSHIKA, T.; BARNETT, C.;

OHASHI, H.; KAWAME, H.; HASEGAWA, T.; OKUTANI, T.; NAGASHIMA, T. *et al.* Gain-of-function mutation in *RIT1* cause Noonan syndrome, a RAS/MAPK pathway syndrome. **The American Journal of Human Genetics**, v.93, p.173-180, 2013.

AOKI, Y.; NIIHORI, T.; INOUE, S.; MATSUBARA, Y. Recent advances in RASopathies. **Journal of Human Genetics**, v.61, p.33-39, 2016.

ARCOS-BURGOS, M.; MUENKE, M. Genetics of population isolates. **Clinical Genetics**, v.61, n.4, p.233-247, 2002.

ARIMA, Y.; HAYASHI, H.; SASAKI, M.; HOSONAGA, M.; GOTO, T. M.; CHIYODA, T.; KUNINAKA, S.; SHIBATA, T.; OHATA, H.; NAKAGAMA, H.; TAYA, Y.; SAYA, H. Induction of ZEB proteins by inactivation of RB protein is key determinant of mesenchymal phenotype of breast cancer. **The Journal of Biological Chemistry**, v.287, p.7896–7906, 2012.

ARNOLD, K.; BORDOLI, L.; KOPP, J.; SCHWEDE, T. The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. **Bioinformatics**, v.22, p.195-201, 2006.

ARS, E.; SERRA, E.; DE LA LUNA, S.; ESTIVILL, X.; LÁZARO, C. Cold shock induces the insertion of a cryptic exon in the neurofibromatosis type 1 (*NF1*) mRNA. **Nucleic Acids Research**, v.28, n.6, p.1307–1312, 2000.

BADER, J. L. Neurofibromatosis and Cancer. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.486, p. 57-65, 1986.

BALLESTER, R.; MARCHUK, D.; BOGUSKI, M.; SAULINO, A.; LETCHER, R.; WIGIER, M.; COLLINS, F. The *NF1* locus encodes a protein functionally related to mammalian GAP and yeast IRA proteins. **Cell**, v.63, n.4, p.851–859, 1990.

BARALLE, D.; MATTOCKS, C.; KALIDAS, K.; ELMSLIE, F.; WHITTAKER, J.; LEES, M.; RAGGE, N.; PATTON, M. A.; WINTER, R. M.; FFRENCH-CONSTANT, C. Different mutations in the *NF1* gene are associated with Neurofibromatosis-Noonan syndrome (NFNS). **American Journal of Medical Genetics**, v. 119A, p. 1-8. 2003.

BARKER, D.; WRIGHT, E.; NGUYEN, K.; CANNON, L.; FAIN, P.; GOLDFAR, D.; BISHOP, D. T.; CAREY, J.; BATY, B.; KIVLIN, J.; WILLARD, H.; WAYE, J. S.; GREIG, G.; LEINWAND, L.; NAKAMURA, Y.; O'CONNELL, P.; LEPPERT, M.; LALOUEL, J.M.; WHITE, R.; SKOLNICK, M. Gene for von Recklinghausen neurofibromatosis is in the pericentromeric region of chromosome 17. **Science**, v. 236, p.1100-1102, 1987.

BARRON, V. A.; LOU, H. Alternative splicing of the neurofibromatosis type 1 pre-mRNA. **Bioscience Reports**, v.32, p. 131-138. 2012.

BASU, T. N.; GUTMANN, D. H.; FLETCHER, J. A.; GLOVER, T. W.; COLLINS, F. S.; DOWNWAARD, J. Aberrant regulation of ras proteins in malignant tumour cells from type 1 neurofibromatosis patients. **Nature**, v.356, n.6371, p.713–715, 1992.

BENKERT, P.; BIASINI, M.; SCHWEDE, T. *Toward the estimation of the quality of individual protein structure models.* **Bioinformatics**, v.27, n.3, p.343-350, 2010.

BERNARDS, A.; HAASE, V. H.; MURTHY, A. E.; MENON, A.; HANNIGAN, G. E.; GUSELLA, J. F. *Complete human NF1 cDNA sequence: two alternatively spliced mRNAs and absence of expression in a neuroblastoma line.* **DNA and Cell Biology**, v.11, p.727-734, 1992.

BERRY, D. A.; PARMIGIANI, G.; SANCHEZ, J.; SCHILDKRAUT, J.; WINER, E. *Probability of carrying a mutation of breast-ovarian cancer gene BRCA1 based on family history.* **Journal of the National Cancer Institute**, v.89, p.227-238, 1997.

BERRY, D. A.; IVERSEN, E. S.; GUDBJARTSSON, D. F.; HILLER, E. H.; GARBER, J. E.; PESHKIN, B. N.; LERMAN, C.; WATSON, P.; LYNCH, H. T.; HILSENBECK, S. G.; RUBINSTEIN, W. S.; HUGHES, K. S.; PARMIGIANI, G. *BRCAPRO validation, sensitivity of genetic testing of BRCA1/BRCA2, and prevalence of other breast cancer susceptibility genes.* **Journal of Clinical Oncology**, v.20, p.2701-2712, 2002.

BERTOLA, D. R.; YAMAMOTO, G. L.; ALMEIDA, T. F.; BUSCARILLI, M.; JORGE, A. A. L.; MALAQUIAS, A. C.; KIM, C. A.; TAKAHASHI, V. N. V.; PASSOS-BUENO, M. R.; PEREIRA, A. C. *Further evidence of the importance of RIT1 in Noonan Syndrome.* **American Journal of Medical Genetics Part A**, v.164, n.11, p.2952-2957, 2014.

BIASINI, M.; BIENERT, S.; WATERHOUSE, A.; ARNOLD, K.; STUDER, G.; SCHMIDT, T.; KIEFER, F.; CASSARINO, T. G.; BERTONI, M.; BORDOLI, L.; SCHWEDE, T. *SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information.* **Nucleic Acids Research**, v.42, ed. W1, p.252-258, 2014.

BILGÜVAR, K.; OZTÜRK, A. K.; LOUVI, A.; KWAN, K. Y.; CHOI, M.; TATLI, B.; *et al.* *Whole-exome sequencing identifies recessive WDR62 mutations in severe brain malformations.* **Nature**, v.467, p.207-210, 2010.

BIRCH, J. M.; HARTLEY, A. L.; TRICKER, K. J.; PROSSER, J.; CONDIE, A.; KELSEY, A. M.; HARRIS, M.; JONES, P. H.; BINCHY, A.; CROWTHER, D. *Prevalence and diversity of constitutional mutations in the p53 gene among 21 Li-Fraumeni families.* **Cancer Research**, v.54, p.1298-1304, 1994.

BLAQUET, V.; TURLEAU, C.; GROSS-MORAND, M. S.; SÉNAMAUD-BEAUFORT, C.; DOZ, F.; BESMOND, C. *Spectrum of germline mutation in the RB1 gene: a study of 232 patients with hereditary and non hereditary retinoblastoma.* **Human Molecular Genetics**, v.4, n.3, p.383-388, 1995.

BLATT, J.; POWELL, C. M.; BURKHART, C. N.; STAVAS, J.; AYLSWORTH, A. S. *Genetics of hemangiomas, vascular malformations and primary lymphedema.* **Journal of Pediatric Hematology/Oncology**, v.36, n.8, p. 587-593, 2014.

BOLLANG, G.; MCCORMICK, F.; CLARK, R. *Characterization of full-length neurofibromina: tubulin inhibits Ras GAP activity. The EMBO Journal*, v.12, n.5, p.1923-1927. 1993.

BOSCHMANN, S. E. **Análise genética da persistência da lactase nas populações menonita e euro-brasileirado sul do Brasil.** 102 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Interna e Ciências da Saúde) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

BOTTEMA, C. D. K.; SARKAR, G.; CASSADY, J. D.; LI, S.; DUTTON, C. M.; SOMMER, S. S. *Polymerase chain reaction amplification of specific alleles: a general method of detection of mutations, polymorphisms, and haplotypes. Methods in Enzymology*, v.218, p.388-402, 1993.

BOLDT, A. B. W.; CULPI, L.; TSUNETO, L. T.; SOUZA, I. R.; KUN, J. F. J.; PETZL-ERLER, M. L. *Analysis of the CCR5 gene coding region diversity in five South American populations reveals two new non-synonymous alleles in Amerindians and high CCR5\*Δ32 frequency in Euro-Brazilians. Genetics and Molecular Biology*, v.32, n.1, p.12-19. 2009.

BRUNONI, D. Aconselhamento Genético. *Ciência Saúde Coletiva*, v.7, n.1. 2002.

CASTLE, B.; BASER, M. E.; HUSON, S. M.; COOPER, D. N.; UPADHYAYA, M. *Evaluation of genotype-phenotype correlations in neurofibromatosis type 1. Journal of Medical Genetics*, v.40, n.10, p.1-5, 2003.

CHEN, P.-C.; YIN, J.; YU, H.-W.; YUAN, T.; FERNANDEZ, M.; YUNG, C. K.; TRINH, Q. M.; PELTEKOVA, V. D.; REID, J. G.; TWORONG-DUBE, E.; MORGAN, M. B.; MUZNY, D. M.; STEIN, L.; MCOHERSON, J. D.; ROBERTS, A. E.; GIBBS, R. A.; NEEL, B. G.; KUCHERLAPATI, R. Next-generation sequencing identifies rare variants associated with Noonan syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.111, n.31, p.11473-11478, 2014.

CICHOWSKI, K.; JACKS, T. *NF1 tumor suppressor gene function: narrowing the gap. Cell*, v.104, p.593-604, 2001.

CHEN, R. H.; SARNECKI, C.; BLENIS, J. *Nuclear localization and regulation of erk- and rsk-encoded protein kinases. Molecular and Cellular Biology*, v.12, p.915-927, 1992.

COBRINK, D. *Pocket proteins and cell cycle control. Oncogene*, v.24, p.2796-2809, 2005.

COLLIN, G. B.; MARSHALL, J. D.; IKEDA, A.; SO, W. V.; RUSSELL-EGGITT, I.; MAFFEI, P.; BECK, S.; BOERKOEL, C. F.; SICOLO, N.; MARTIN, M.; NISHINA, P. M.; NAGGERT, J. K. *Mutations in ALMS1 cause obesity, type 2 diabetes and neurosensory degeneration in Alstrom syndrome. Nature Genetics*, v.31, p.74-78, 2002.



COLMAN, S. D.; WILLIAMS, C. A.; WALLACE, M. R. *Benign neurofibromas in type 1 neurofibromatosis (NF1) show somatic deletions of the NF1 gene.* **Nature Genetics**, v.11, p.90–92, 1995.

COUCH, F. J.; NATHANSON, K. L.; OFFIT, K. *Two decades after BRCA: setting care and prevention.* **Science**, v.343, p.1466–1471, 2014.

CROWE, F.; SCHULL, W.; NEEL, J. *A Clinical, Pathological, and Genetic Study of Multiple Neurofibromatosis.* **Springfield**, Illinois. 1956.

CYBULSKI, C.; LUBINSKI, J.; WOKOŁORCZYK, D.; KUZNIAK, W.; KASHYAP, A.; SOPIK, V.; HUZARSKI, T.; GRONWALD, J.; BYRSKI, T.; SZWIEC, M.; JAKUBOWSKA, A.; GORSKI, B.; DEBNIAK, T.; NAROD, S. A.; AKBARI, M. R. *Mutations predisposing to breast cancer in 12 candidate genes in breast cancer patients from Poland.* **Clinical Genetics**, v.88, n.4, p.1–5, 2014.

DALY, M. B.; AXILBUND, J. E.; BUYS, S.; CRAWFORD, B.; FARRELL, C. D.; FRIEDMAN, S.; GARBER, J. E.; GOORHA, S.; GRUBER, S. B.; HAMPEL, H.; KAKLAMANI, V.; KOHLMANN, W.; KURIAN, A.; LITTON, J.; MARCOM, P. K.; NUSSBAUM, R.; OFFIT, K.; PAL, T.; PASCHE, B.; PILARSKI, R.; *et al.* *Genetic/familial high-risk assessment: breast and ovarian.* **Journal National Comprehensive Cancer Network**, v.8, n.5, p.562-594, 2010.

DANGLLOT, G.; REGNIER, V.; FAUVET, D.; VASSAL, G.; KUJAS, M.; BERNHEIM, A. *Neurofibromatosis 1 (NF1) mRNAs expressed in the central nervous system are differentially spliced in the 5' part of the gene.* **Human Molecular Genetics**, v.4, p.915–920. 1995.

DANGLLOT, G.; TEINTURIER, C.; DUVERGER, A.; BERNHEIM, A. *Tissue-specific alternative splicing of neurofibromatosis 1 (NF1) mRNA.* **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.48, p.365-372. 1994.

DANTAS, E. L. R.; SÁ, F. H. L.; CARVALHO, S. M. F.; ARRUDA, A. P.; RIBEIRO, E. M.; RIBEIRO, E. M. *Genética do cancer hereditário.* **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.55, n.3, p.263-269, 2009.

DASTON, M. M.; SCRABLE, H.; NORDLUND, M.; STRBAUM, A. K.; NISSEN, L. M.; RATNER, N. *The protein product of the neurofibromatosis type 1 gene is expressed at highest abundance in neurons, Schwann cells, and oligodendrocytes.* **Neuron**, v.8, n.3, p.415–428, 1992.

DASGUPTA, B.; DUGAN, L. L.; GUTMANN, D. H. *The neurofibromatosis 1 gene product neurofibromin regulates pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-mediated signaling in astrocytes.* **The Journal of Neuroscience**, v.23, n.26, p.8949–8954, 2003.

DASGUPTA, B.; GUTMANN, D. H. *Neurofibromin regulates neural stem cell proliferation, survival, and astroglial differentiation in vitro and in vivo.* **The Journal of Neuroscience**, v.25, n.23, p.5584–5594, 2005.

DASGUPTA, B.; YI, Y.; CHEN, D. Y.; WEBWE, J. D.; GUTMANN, D. H. *Proteomic analysis reveals hyperactivation of the mammalian target of rapamycin*

pathway in neurofibromatosis 1-associated human and mouse brain tumors. **Cancer Research**, v.65, n.7, p.2755–2760, 2005.

DE CLUE, J. E.; COHEN, B. D.; LOWY, D. R. *Identification and characterization of the neurofibromatosis type 1 protein product.* **Proceedings National Academy of Sciences**, v.88, n.22, p.9914–9918, 1991.

DE CLUE, J. E.; PAPAGEORGE, A. G.; FLETCHER, J. A.; DIEHL, S. R.; RATNER, N.; VASS, W. C.; LOWY, D. R. *Abnormal regulation of mammalian p21ras contributes to malignant tumor growth in von Recklinghausen (type 1) neurofibromatosis.* **Cell**, v.69, n.2, p.265–273, 1992.

DE LUCA, A.; BOTTILLO, I.; SARKOZY, A.; CARTA, C.; NERI, C.; BELLACCHIO, E.; SCHIRINZI, A.; CONTI, E.; ZAMPINO, G.; BATTAGLIA, A.; MAJORE, S.; RINALDI, M. M.; CARELLA, M.; MARINO, B.; PIZZUTI, A.; DIGILIO, M. C.; TARTAGLIA, M.; DALLAPICCOLA, B. *NF1 Gene Mutations Represent the Major Molecular Event Underlying Neurofibromatosis-Noonan Syndrome.* **The American Journal of Human Genetics**, v.77, p.1092-1101, 2005.

DOHERTY, D.; CHUDLEY, A. E.; COGHLAN, G.; ISHAK, G. E.; INNES, A. M.; LEMIRE, E. G.; ROGERS, R. C.; MHANNI, A. A.; PHELPS, I. G.; JONES, S. J.; ZHAN, S. H.; FEJES, A. P.; SHAHIN, H.; KANAAN, M.; AKAY, H.; TEKIN, M.; CANADA FORGE CONSORTIUM, TRIGGS-RAINE, B.; ZELINSKI, T. *GPSM2 mutations cause the brain malformations and hearing loss in Chudley–McCullough syndrome.* **The American Journal of Human Genetics**, v.90, p.1088–1093, 2012.

DÜCK, A. S. **Witmarsum, uma comunidade trilingue: Plautdietsch, Hochdeutsch e Português.** 152 f. Dissertação (Mestrado em estudos linguísticos), Universidade Federal do Paraná, 2005.

EASTON, D. F.; PONDER, M. A.; HUSON, S. M.; PONDER, B. A. J. *An analysis of variation in expression of neurofibromatosis (NF) type 1 (NF1): evidence for modifying genes.* **The American Journal of Human Genetics**, v.53, n.2, p.305–313, 1993.

ECONOMOPOULOU, P.; DIMITRIADIS, G.; PSYRRI, A. *Beyond BRCA: new hereditary breast cancer susceptibility genes.* **Cancer Treatment Reviews**, v.41, p.1–8, 2015.

ESTEVES, V.F.; THULER, L. C. S.; AMÊNDOLA, L. C.; KOIFMAN, R. J.; FRANKEL, P. P.; VIEIRA, R. J. S AND *The Brazilian Network of Breast and Ovarian Familial Cancer Aggregation. Prevalence of BRCA1 and BRCA2 gene mutations in families with médium and high risk of breast and ovarian câncer in Brazil.* **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v.42, p.453-457. 2009.

EKVALL, S.; SJÖRS, K.; JONZON, A.; VIHINE, M.; ANNERÉN, G.; BONDESON, M. L. *Novel association of neurofibromatosis type 1-causing mutations in families*

with neurofibromatosis-Noonan syndrome. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v.164A, p. 579-587, 2014.

EVANS, D. G.; ECCLES, D. M.; RAHMAN, N.; YOUNG, K.; BULMAN, M.; AMIR, E.; SHENTON, A.; HOWELL, A.; LALLOO, F. A new scoring system for the chances of identifying a BRCA1/ 2 mutation outperforms existing models including BRCAPRO. **Journal of Medical Genetics**, v.41, p.474-480, 2004.

FELDKAMP, M. M.; ANGELOV, L.; GUHA, A. Neurofibromatosis type 1 peripheral nerve tumors: aberrant activation of the Ras pathway. **Surgical Neurology**, v.51, n.2, p.211–218, 1999.

FERRAND, A.; SIU, V. M.; RUPAR, C. A.; NAPIER, M. P.; AL-DIRBASHI, O. Y.; CHARKRABORTY, P.; PRASAD, C. Biochemical and Hematologic Manifestations of Gastric Intrinsic Factor (GIF) Deficiency: A Treatable Cause of B12 Deficiency in the Old Order Mennonite Population of Southwestern Ontario. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v.18, p.69-77, 2014.

FORD, D.; EASTON, D. F.; BISHOP, D. T.; NAROD, S. A.; GOLDGAR, D. E.; BREAST CANCER CONSORTIUM. Risks of cancer in BRCA1-mutation carriers. **The Lancet**, v.343, n.8899, p.692-695, 1994.

FOSTIRA, F.; THODI, G.; KONSTANTOPOULOU, I.; SANDALTZOPOULOS, R.; YANNOUKAKOS, D. Hereditary cancer syndromes. **Journal of Balkan Union of Oncology**, v.12, Suppl 1, p.S13-S22, 2007.

FOULKES, W. D. Inherited susceptibility to common cancers. **The New England Journal of Medicine**, v.359, n.20, p.2143-2153, 2008.

FRANK, T. S.; DEFFENBAUGH, A. M.; REID, J. E.; HULICK, M.; WARD, B. E.; LINGENFELTER, B.; GUMPPER, K. L.; SCHOLL, T.; TAVTIGIAN, S. V.; PRUSS, D. R.; CRITCHFIELD, G. C. Clinical characteristics of individuals with germline mutations in BRCA1 and BRCA2: analysis of 10,000 individuals. **Journal of Clinical Oncology**, v.20, p.1480-1490, 2002.

FREIRE-MAIA, N. **Tópicos de genética humana**. 1 ed. São Paulo: Hucitec EDUSP. 1976.

FRIEDENSON, B. The BRCA1/2 pathway prevents hematologic cancers in addition to breast and ovarian cancers. **BMC Cancer**, v.7, p.152, 2007.

FRODIN, M.; GAMMELTOFT, S. Role and regulation of 90 kDa ribosomal S6 kinase (RSK) in signal transduction. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.151, p.65–77, 1999.

FU, J. F.; HSU, J. J.; TANG, T. C.; SHIH, L. Y. Identification of CBL, a Proto-oncogene at 11q23.3, as a novel MLL fusion partner in a patient with de novo acute myeloid leukemia. **Genes, Chromosomes & Cancer**, v.37, p.214-219, 2003.

GALLIANO, M. F.; TOULZA, E.; GALLINARO, H.; JONCA, N.; ISHIDA-YAMAMOTO, A.; SERRE, G.; GUERRIN, M. A novel protease inhibitor of the

*alpha2-macroglobulin family expressed in the human epidermis. **The Journal of Biological Chemistry**, v.281, p.5780–5789, 2006.*

GARBER, J. E.; OFFIT, K. *Hereditary cancer predisposition syndromes. **Journal of Clinical Oncology**, v.23, n. 2, p. 276-292. 2005.*

GÉNIN, E.; FEINGOLD, J.; CLERGET-DARPOUX, F. *Identifying modifier genes of monogenic disease: strategies and difficulties. **Human Genetics**, v.124, p.357-368, 2008.*

GILPIN, C. A.; CARSON, N.; HUNTER, A. G. *A preliminary validation of a family history assessment form to select women at risk for breast or ovarian cancer for referral to a genetics center. **Clinical Genetics**, v.58, p.299-308, 2000.*

GLOBOCAN. *Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012*. Disponível em < <http://globocan.iarc.fr/>>. Acesso em: março de 2016.

GOH, G.; CHOI, M. *Application of whole exome sequencing to identify disease-causing variants in inherited human disease. **Genomics & Informatics**, v.10, n.4, p.214-219, 2012.*

GOS, M.; FAHIMINIYA, S.; POZNANSKI, J.; KLAPECKI, J.; OBERSZTYN, E.; PIOTROWICZ, M.; WIERZBA, J.; POSMYK, R.; BAL, J.; MAJEWSKI, J. *Contribution of RIT1 mutations to the pathogenesis of Noonan syndrome: four new cases and further evidence of heterogeneity. **American Journal of Medical Genetics Part A**, 2014.*

GRAESER, M. K.; ENGEL, C.; RHIEM, K.; GADZICKI, D.; BICK, U.; KAST, K.; FROSTER, U. G.; SCHLEHE, B.; BECHTOLD, A.; ARNOLD, N.; PREISLER-ADAMNS, S.; NESTLE-KREEMLING, C.; ZAINO, M.; LOEFFLER, M.; KIECHLE, M.; MEINDL, A.; VARGA, D.; SCHMUTZLER, R. K. *Contralateral breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. **Journal of Clinical Oncology**, v.27, p.5887-92, 2009.*

GREGORY, P. E.; GUTMANN, D. H.; MITCHELL, A.; PARK, S.; BOGUSKI, M.; JACKS, T.; WOOD, D. L.; JOVE, R.; COLLINS, F. S. *Neurofibromatosis type 1 gene product (neurofibromin) associates with microtubules. **Somatic Cell and Molecular Genetics**, v.19, n.3, p.265–274, 1993.*

GRIMM, T.; ZERRES, K. *Genetic Counseling and Prenatal Diagnosis. In: SPEICHER, M. R.; ANTONARAKIS, S. E.; MOTULSKY, A. G. **Human Genetics. Problems and Approaches**. 4ed. New York:Springer. p.845-873, 2010.*

GUEDES, C.; DINIZ, D. *A Ética na História do Aconselhamento Genético: um Desafio à Educação Médica. **Revista Brasileira de Educação Médica**, v. 33, n.2, p. 247-252, 2009.*

GUHA, A.; LAU, N.; HUVAR, I.; GUTMAN, D.; PROVIAS, J.; PAWSON, T.; BOSS. *Ras-GTP levels are elevated in human NF1 peripheral nerve tumors. **Oncogene**, v.12, n.3, p.507–513, 1996.*

GUTMANN, D. H.; ANDERSEN, L. B.; COLE, J. L.; SWAROOP, M.; COLLINS, F. S. *An alternatively-spliced mRNA in the carboxy terminus of the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene is expressed in muscle.* **Human Molecular Genetics**, v.2, p.989–992, 1993.

GUTMANN, D. H.; GEIST, R. T.; ROSE, K.; WRIGHT, D. E. *Expression of two new protein isoforms of the neurofibromatosis type 1 gene product, neurofibromin, in muscle tissues.* **Developmental Dynamics**, v.202, n.3, p.302–311, 1995.

GUTMANN, D. H.; WOOD, D. L.; COLLINS, F. S. *Identification of the neurofibromatosis type 1 gene product.* **Proceedings National Academy of Sciences**, v.88, n.21, p.9658–9662, 1991.

GUTMANN, D. H.; ZHANG, Y.; HIRBE, A. *Developmental regulation of a neuron-specific neurofibromatosis 1 isoform.* **Annals of Neurology**, v.46, n.5, p.777–782, 1999.

HANAHAH, D.; WEINBERG, R.A. *The hallmarks of cancer.* **Cell**, v.100, p.57-70, 2000.

HANAHAH, D.; WEINBERG, R. A. *Hallmarks of cancer: The next generation.* **Cell**, v.144, p.646-674, 2011.

HANNUM, J. S. S. **Aconselhamento genético: Análise e contribuições a partir do modelo do Aconselhamento psicológico.** 79 f. Dissertação (Mestrado em Psicologia), Pontifícia Universidade Católica de Goiás, 2011.

HARTMANN, L. C.; LINDOR, N. M. *The role of risk-reducing surgery in hereditary breast cancer and ovarian cancer.* **The New England Journal of Medicine**, v.374, p.454-468, 2016.

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, p.1-14, 2012.

HINMAN, M. N.; SHARMA, A.; LUO, G.; LOU, H. *Neurofibromatosis type 1 alternative splicing is a key regulator of ras signaling in neurons.* **Molecular and Cellular Biology**, v.34, n.12, p.2188-2197. 2014.

HIROTSU, Y.; NAKAGOMI, H.; SAKAMOTO, I.; AMEMIYA, K.; OYAMA, T.; MOCHIZUKI, H.; OMATA, M. *Multigene panel analysis identified germline mutations of DNA repair genes in breast and ovarian cancer.* **Molecular Genetics & Genomic Medicine**, v.3, n.5, p.459-466, 2015.

HUSON, S. M.; HUGHES, R. A. *The neurofibromatosis: a pathogenetic and clinical overview.* **Chapman and Hall Medical.** 1994.

Instituto Nacional de Câncer. **Estimativas 2014.** Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Coordenação de Prevenção e Vigilância, Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>>, 2012. Acesso em: março de 2016.

Instituto Nacional de Câncer. **Estimativas 2016**. Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Coordenação de Prevenção e Vigilância, Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>>, 2016. Acesso em março de 2016.

IQBAL., J.; RAGONE, A.; LUBINSKI, J.; LYNCH, H. T.; MOLLER, P.; GHADIRIAN, P.; FOULKES, W. D. ARMEL, S.; EISEN, A.; NEUHAUSEN, S. L.; SENTER, L.; SINGER, C. F.; AINSWORTH, P.; KIM-SING, C.; TUNG, N.; FRIEDMAN, E.; LLACUACHAQUI, M.; PING, S.; NAROD, S. S.; HEREDIRATY BREAST CANCER STUDY GROUP. *The incidence of pancreatic cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers*. **British Journal of Cancer**, v.107, p.2005-2009, 2012.

ISSBRUCKER, K.; MARTI, H. H.; HIPPENSTIEL, S.; SPRINGMANN, G.; VOSWINCKEL, R.; GAUMANN, A.; BREIER, G.; DREXLER, H. C. A.; SUTTORP, N.; CLAUSS, M. *p38 MAP kinase—a molecular switch between VEGF-induced angiogenesis and vascular hyperpermeability*. **FASEB Journal**, V.17, P.262–264, 2003.

IZAWA, I.; TAMAKI, N.; SAYA, H. *Phosphorylation of neurofibromatosis type 1 gene product (neurofibromin) by cAMP-dependent protein kinase*. **FEBS Letters**, v.382, n.1, p.53–59, 1996.

JACKSON, J. R.; BOLOGNESE, B.; HILLEGASS, L.; KASSIS, S.; ADAMS, J.; GRISWOLD, D. E.; WINKLER, J. D. *Pharmacological effects of SB 220025, a selective inhibitor of P38 mitogen-activated protein kinase, in angiogenesis and chronic inflammatory disease models*. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.284, p.687–692, 1998.

JAWORSKI, M. A.; SLATER, J. D.; SEVERINI, A.; HENNIG, K. R.; MANSOUR, G.; MEHTA J. G.; JESKE, R.; SCHLAUT, J.; PAK, C. Y.; YOON, J. W. *Unusual clustering of diseases in a Canadian Old Colony (Chortitza) Mennonite kindred and community*. **Canadian Medical Association Journal**, v.138, n.11, p.1017-1025, 1988.

JAWORSKI, M. A.; SEVERINI, A.; MANSOUR, G.; HENNIG, K.; SLATER, J. D.; JESKE, R.; SCHLAUT, J.; YOON, J. W.; MACLAREN, N. K.; NEPOM, G. T. *Inherited Diseases in North American Mennonites: Focus on Old Colony (Chortitza) Mennonites*. **American Journal of Medical Genetics**, v.32, p.158-168, 1989.

JESSEN, K. R.; MIRSKY, R. *Origin and early development of Schwann cells*. **Microscopy Research and Techique**, v.41, p.393–402, 1998.

JIANG, Z.; JONES, R.; LIU, J. C.; DENG, T.; ROBINSON, T.; CHUNG, P. E. D.; WANG, S.; HERSCHKOWITZ, J. I.; EGAN, S. E.; PEROU, C. M.; ZACKSENHAUS, E. *RB1 and p53 at the crossroad of EMT and triple-negative breast cancer*. **Cell Cycle**, v. 10, n.10, p.1563-1570, 2011.

JIMÉNEZ, I. J.; CASADO, Z. G.; SUELA, S. P.; CARDEÑOSA, E. E.; GUERRERO, A. L.; HUERTA, A. S.; GONZÁLEZ, I. C.; HERAS, A. B. S.; FITA, M. J. J.; GARCÍA, I. T.; PONCE, C. G.; DUEÑAS, E. M.; NOGUERA, I. R.;

TREJO, D. S.; SÁEZ, M. G.; GILABERT, P. B. *Novel and recurrent BRCA1/BRCA2 mutations in early onset and familial breast and ovarian cancer detected in the Program of Genetic Counseling in Cancer of Valencian Community (eastern Spain). Relationship of family phenotypes with mutation prevalence.* **Familial Cancer – Springer**. 2013.

JOHANNESSEN, C. M.; RECZEK, E. E.; JAMES, M. F.; BREMS, H.; LEGIUS, E.; CICHOWSKI, K. *The NF1 tumor suppressor critically regulates TSC2 and mTOR.* **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.102, n.24, p.8573–8578, 2005.

JOHNSON, J.; THIJSSSEN, B.; MCDERMOTT, U.; GARNETT, M.; WESSELS, L. F. A.; BERNARDS, R. *Targeting the RB-E2F pathway in breast cancer.* **Oncogene**, 2016.

KAPLAN, P.; ROSENBLATT, B. *A distinctive facial appearance in neurofibromatosis Von Recklinghausen.* **American Journal of Medical Genetics**, v.21, p.463–470, 1985.

KAUFMANN, D.; MULLER, R.; KENNER, O.; LEISTNER, W.; HEIN, C.; VOGEL, W.; BARTELT, B. *The N-terminal splice product NF1-10a-2 of the NF1 gene codes for a transmembrane segment.* **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.294, n.2, p.496–503, 2002.

KELLEY, L. A.; MEZULIS, S.; YATES, C. M.; WASS, M. N.; STERNBERG, M. J. E. *The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis.* **Nature Protocols**, v.10, p.845-858, 2015.

KNUDSON, A., Jr. *Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma.* **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.68, p.820–823, 1971.

KING, M.; MARKS, J. H.; MANDELL, J. B.; BEN-YISHAY, M.; DUTCHER, J. P.; GROSS, S. J. *Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2.* **Science**, v.302, p.643–647, 2003.

KINZLER, K. W.; VOGELSTEIN, B. *Lessons from hereditary colorectal cancer.* **Cell**, v.87, n.2, p.159-70, 1996.

KLASSEN, P. P.; **Dierußland deutschen Mennoniten in Brasilien: Band2–Siedlungen, Gruppen und Gemeinden in der Zerstreuung. Bolanden-Weiherhof: Mennonitischer Geschichtsvereine**, 1998

KLUWE, L.; FRIEDRICH, R.; MAUTNER, V. F. *Loss of NF1 allele in Schwann cells but not in fibroblasts derived from an NF1-associated neurofibroma.* **Genes, Chromosomes and Cancer**, v. 24, p.283–285, 1999.

KOBAYASHI, H.; OHNO, S.; SASAKI, Y.; MATSUURA, M. *Hereditary breast and ovarian cancer susceptibility genes (Review).* **Oncology Reports**, p.1019-1029, 2013.

KURIAN, A. W.; HARE, E. E.; MILLS, M. A.; KINGHAM, K. E.; MCPHERSON, L.; WHITTEMORE, A. S. *et al. Clinical evaluation of a multiple-gene sequencing*

panel for hereditary cancer risk assessment. **Journal of Clinical Oncology**, v.32, n.19, p.2001–2009, 2014.

LADUCA, H.; STUENKEL, A. J.; DOLINSKY, J. S.; KEILES, S.; TANDY, S.; PESARAN, T.; CHEN, E.; GAU, C. L.; PALMAER, E.; SHOAEPUR, K.; SHAH, D.; SPEARE, V.; GANDOMI, S.; CHAO, E. *Utilization of multigene panels in hereditary cancer predisposition testing: analysis of more than 2,000 patients.* **Genetics in Medicine**, v.16, p.830–837, 2014.

LAU, N.; FELDKAMP, M. M.; RONCARI, L.; LOEHR, A.; SHANNON, P.; GUTMANN, D.; GUHA, A. *Loss of neurofibromin is associated with activation of RAS/MAPK and PI3-K/AKT signaling in a neurofibromatosis 1 astrocytoma.* **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v.59, n.9, p.759–767, 2000.

LAUER, K. *Divergent risk of multiple sclerosis in two anabaptist communities in America.* **Medical Hypotheses**, v.67, p.969–974, 2006.

LEE, C. H.; DELLA, N. G.; CHEW, C. E.; ZACK, D. J. *Rin, a neuron-specific and calmodulin-binding small G-protein, and Rit define a novel subfamily of ras proteins.* **Journal of Neuroscience**, v.16, p.6784–6794, 1996.

LI, F. P.; FRAUMENI Jr. J. F. *Rhabdomyosarcoma in children: epidemiologic study and identification of a familial cancer syndrome.* **Journal of the National Cancer Institute**, v.43, p.1365–1373, 1969.

LIQUORI, C. L.; BERG, M. J.; SIEGEL, A. M.; HUANG, E.; ZAWISTOWSKI, J. S.; STOFFER, T.; VERLAAN, D.; BALOGUN, F.; HUGHES, L.; LEEDOM, T. P.; LPUMMER, N. W.; CANNELLA, M.; MAGLIONE, V.; SQUITIERI, F.; JOHNSON, E. W.; ROULEAU, G. A.; PTACEK, L.; MARCHUK, D. A. *Mutations in a gene encoding a novel protein containing a phosphotyrosine-binding domain cause type 2 cerebral cavernous malformations.* **American Journal of Human Genetics**, v.73, p.1459–1464, 2003.

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

LYNCH, T. M.; GUTMANN, D. H. *Neurofibromatosis 1.* **Neurologic Clinics**, v.20, n.3, p. 841-865. 2002.

MACLEOD, K. *Tumor suppressor genes.* **Current Opinion in Genetics & Development**, v.10, p. 81-93, 2000.

MAJEWSKI, J.; SCHWARTZENTRUBER, J.; LALONDE, E.; MONTPETIT, A.; JABADO, N. *What can exome sequencing do for you?* **Journal of Medical Genetics**, v.48, p.580–589, 2011.

MALAQUIAS, A. C.; FERREIRA, L. V.; SOUZA, S. C.; ARNHOLD, I. J. P.; MENDONÇA, B. B.; JORGE, A. A. L. *Síndrome de Noonan: do fenótipo à terapêutica com hormônio de crescimento.* **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v.52, n.5, p.800-808, 2008.



MATSUMOTO, T.; TURESSON, I.; BOOK, M.; GERWINS, P.; CLAESSION-WELSH, L.; *p38 MAP kinase negatively regulates endothelial cell survival, proliferation, and differentiation in FGF-2-stimulated angiogenesis. **The Journal of Cell Biology***, v.156, n.1, p.149–160, 2002.

MARTINELLI, S.; DE LUCA, A.; STELLACCI, E.; ROSSI, C.; CHECQUOLO, S.; LEPRI, F.; CAPUTO, V.; SILVANO, M.; BUSCHERINI, F.; CONSOLI, F.; FERRARA, G.; DIGILIO, M. C.; CAVALIERE, M. L.; VAN HAGEN, J. M.; ZAMPIO, G.; VAN DER BURGT, I.; FERRERO, G. B. *et al. Heterozygous germline mutations in the CBL tumor-suppressor gene cause a Noonan syndrome-like phenotype. **American Journal of Human Genetics***, v. 87, n.2, p250–257, 2010.

MASKE, W. Bíblia e Arado. **Os menonitas e a construção do Seu reino**. 202 f. Dissertação (Mestrado em História), Universidade Federal do Paraná, 1999.

MARTIN, G. A.; VISKOCHIL, D.; BOLLAG, G.; MACCABE, P. C.; CROSIER, W. J.; HAUBRUCK, H.; CONROY, L.; CLARK, R.; O'CONNELL, P.; CAWTHON, R. M.; INNIS, M. A.; MCCORNICK, F. *The GAP-related domain of the neurofibromatosis type 1 gene product interacts with ras p21. **Cell***, v.63, n.4, p.843–849, 1990.

MECKLIN, J. P.; JÄRVINEN, H. J. *Surveillance in Lynch syndrome. **Familial Cancer***, v.4, n.3, p.267-271, 2005.

MERCADO, R. C.; HAMPEL, H.; KASTRINOS, F.; STEYERBERG, E.; BALMANA, J.; STOFFEL, E.; COHN, D. E.; BACKES, F. J.; HOPPER, J. L.; JENKINS, M. A.; LINDOR, N. M.; CASEY, G.; HAILE, R.; MADHAVAN, S.; DE LA CHAPELLE, A.; SYNGAL, S.; THE COLON CANCER FAMILY REGISTRY. *Performance of PREMM<sub>1,2,6</sub>, MMRpredict, and MMRpro in detecting Lynch syndrome among endometrial cancer cases. **Genetics in Medicine***, v.14, n.7, p.670-680, 2012.

MERSCH, J.; JACKSON, M. A.; PARK, M.; NEBGEN, D.; PETERSON, S. K.; SINGLETARY, C.; ARUN, B. K.; LITTON, J. K. *Cancers associated with BRCA1 and BRCA2 mutations other than breast and ovarian. **Cancer***, v.121, n.2, p.269-275, 2015.

MESSIAEN, L. M.; WIMMER, K. *NF1 Mutational Spectrum. **Monographs in Human Genetics***, v.16, p. 63-77. 2008.

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

MORAN, A.; O'HARA, C.; KHAN, S.; SHACK, L.; WOODWARD, E.; MAHER, E. R.; LALLOO, F.; EVANS, D. G. R. *Risk of cancer other than breast or ovarian in individuals with BRCA1 and BRCA2 mutation. **Familial Cancer***, v.11, p.235-242, 2011.

MUKHERJEE, A. **O Imperador de todos os males**. Uma biografia do câncer. São Paulo: Companhia das Letras, 2012.

NAGY, R.; SWEET, K.; ENG, C. *Highly penetrant hereditary cancer syndromes. **Oncogene***, v.23, p.6445-6470, 2004.

NAKAMURA, K.; FIKE, F.; HAGHAYEGH, S.; SAUNDERS-PULLAN, R.; DAWSON, A. J.; DÖRK, T.; GATTI, R. A. A-T<sup>Winnipeg</sup>: *Pathogenesis of rare ATM missense mutation c.6200C>A decreased protein expression. And downstream signaling, early-onset dystonia, cancer and life-threatening radiotoxicity. **Molecular Genetics and Genomic Medicine***, v.2, n.4, p.332-340, 2014.

NEWTON, C. R.; GRAHAM, A.; HEPTMSTALL, L. E.; POWELL, S. J.; SUMMERS, C.; KALSHEKER, N.; SMITH, J. C.; MARKHAM, A. F. Analysis of any point mutation in DNA. *The amplification refractory mutation system (ARMS). **Nucleic Acids Research***, v.17, p.2503-2516, 1989.

NIEMEYER, C. M.; KANG, M. W.; SHIN, D. H.; FURLAN, I.; ERLACHER, M.; BUNIN, N. J.; BUNDA, S.; FINKLESTEIN, J. Z.; SAKAMOTO, K. M.; GORR, T. A.; MEHTA, P.; SCHMID, I.; KROPSHOFER, G.; CORBACIOGLU, LANG, P. J. *et al. Germline CBL mutations cause developmental abnormalities and predispose to juvenile myelomonocytic leukemia. **Nature Genetics***, v. 42, p.794–800, 2010.

NIKKEL, M.; KLIEWER, H. G. **Witmarsum em quarto décadas**. Witmarsum in vier Jahrzehnten 1951-1991. Kugler Artes Gráficas LTDA,138p, 1991.

NOONAN, J. A.; EHMKE, D. A. *Associated noncardiac malformations in children with congenital heart disease. **Journal of Pediatrics***, v.63, p.468-470, 1963.

NYSTRÖM, A. M.; EKVALL, S.; ALLANSON, J.; EDBY, C.; ELINDER, M.; HOLMSTRÖM, G.; BONDESON, M. L.; ANNERÉN, G. *Noonan syndrome and neurofibromatosis type 1 in a family with a novel mutation in NF1. **Clinical Genetics***, v.76, n.6, p.524-34, 2009.

NUSSBAUM, R. L.; McINNES, R. R.; WILLARD, H. F. Thompson & Thompson **Genetics in Medicine**. 6 ed. W.B. Saunders Company. 2001.

**OMIM**. Banco de dados disponível em < <http://omim.org/>>. Acesso em: março de 2016.

ORMOND, K. E. *From genetic counseling to “genomic counseling”.* **Molecular Genetics & Genomic Medicine**, v.1, n.4, p.189-193, 2013.

O'ROAK, B. J.; VIVES, L.; GIRIRAJAN, S.; KARAKOC, E.; KRUMM, N.; COE B. P.; *et al. Sporadic autism exomes reveal a highly interconnected protein network of de novo mutations. **Nature***, v.485, p.246-250, 2012.

ORTON, N. C.; INNES, A. M.; CHUDLEY, A. E.; BECH-HANSEN, N. T. *Unique Disease Heritage of the Dutch-German Mennonite Population. **American Journal of Medical Genetics Part A***, v.146A, n. 8, p. 1072-1087, 2008.

PALMER, C.; SZUDEK, J.; JOE, H.; RICCARDI, V. M.; FRIEDMAN, J. M. *Analysis of neurofibromatosis 1 (NF1) lesions by body segment. **American Journal of Medical Genetics Part A***, v.125, n.2, p.157–161, 2004.

PANCHAL, S. M.; ENNIS, M.; CANON, S.; BORDELEAU, L. J. *Selecting a BRCA risk assessment model for use in a familial cancer clinic. BMC medical Genetics*, v.9, p. 116-124, 2008.

PAN, D.; DONG, J.; ZHANG, Y.; GAO, X. *Tuberous sclerosis complex: from Drosophila to human disease. Trends in Cell Biology*, v.14, n.2, p.78–85, 2004.

PAPADOPOULOS, N.; NICOLAIDES, N. C.; WEI, Y. F.; RUBEN, S. M.; CARTER, K. C.; HASELTINE, W. A.; FLEISCHMANN, R. D.; FRASER, C. M.; ADAMS, M. D. *et al. Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer. Science*, v.263, n.5153, p.1625-9,1994.

PARMIGIANI, G.; BERRY, D.; AGUILAR, O. *Determining carrier probabilities for breast cancer-susceptibility genes BRCA1 and BRCA2. The American Journal of Human Genetics*, v.62, p.145-158, 1998.

PARK, V. M.; KENWRIGHT, K. A.; STURTEVANT, D. B.; PIVNICK, E. K. *Alternative splicing of exons 29 and 30 in the neurofibromatosis type 1 gene. Human Genetics*, v.103, n.4, p.382–385, 1998.

PAULS JUNIOR, P. **Witmarsum in Paraná**. Curitiba: Imprimax, 1976.

PAULS JUNIOR., P. **Mennoniten in Brasilien**, Witmarsum, 1980.

PENNER, H.; GERLACH, H.; QUIRING, H. **Weltweite Bruderschaft**. Weierhof: Mennonitischer Geschichtsverein. 1984.

PERONDINI, A. L. P. *Crodowaldo Pavan e a Genética no Brasil. Ciência e Cultura*, v.62, n.2, p.5-8, 2010.

PHAROAH, P. D. P.; DAY, N. E.; DUFFY, S.; EASTON, D. F.; PONDER, B. A. J. *Family history and the risk of breast cancer: a systematic review and meta-analysis. International Journal of Cancer*, v.71, p.800-809, 1997.

PHELAN, C. M.; IQBAL, J.; LYNCH, H. T.; LUBINSKI, J.; GRONWALD, J.; MOLLER, P.; GHADIRIAN, P.; FOULKES, W. D.; ARMEL, S.; EISEN, A.; NEUHAUSEN, S. L.; SENTER, L.; SINGER, C. F.; AINSWORTH, P.; KIM-SING, C.; TUNG, N.; LLACUACHAQUI, M.; CHORNOKUR, G.; PING, S.; NAROD, S. A.; HEREDITARY BREAST CANCER STUDY GROUP. *Incidence of colorectal cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from a follow-up study. British Journal of Cancer*, p.1-5, 2013.

POUCHET, C. J.; WONG, N.; CHONG, G.; SHEEHAN, M. J.; SCHNEIDER, G.; ROSEN-SHEIDLEY, B.; FOULKES, W.; TISCHKOWITZ, M. *A comparison of models used to predict MLH1, MSH2 and MSH6 mutation carriers. Annals of Oncology*, v.20, p.681-688, 2009.

PROKOFYEVA, D.; BOGDANOVA, N.; DUBROWINSKAJA, N.; BERMISHEVA, M.; TAKHIROVA, Z.; ANTONENKOVA, N.; TURMANOV, N.; DATSYUK, I.; GANTSEV, S.; CHRISTIANSEN, H.; PARK-SIMON, T-W.; HILLEMANN, P.; KHUSNUTDINOVA, E.; DÖRK, T. *Nonsense mutation p.Q548X in BLM, the gene*

mutated in Bloom's syndrome, is associated with breast cancer in Slavic populations. **Breast Cancer Research and Treatment**, v.137, p. 533-539, 2013.

RAHNER, N.; STEINKE, V. *Hereditary cancer syndromes*. **Deutsches Ärzteblatt International**, v.105, n.41, p.706–714, 2008.

RASMUSSEN, S.A.; OVERMAN, J.; THOMSON, S.A.; COLMAN, S.D.; ABERNATHY, C.R.; TRIMPERT, R.E.; MOOSE, R.; VIRDI, G.; ROUX, K.; BAUER, M.; ROJANI, A. M.; MARIA, B. L.; MUIR, D.; WALLACE, M. R. *Chromosome 17 loss-of-heterozygosity studies in benign and malignant tumors in neurofibromatosis type 1*. **Genes, Chromosomes & Cancer**, v.28, p.425–431, 2000.

REIG, I.; BOIXEDA, P.; FLETA, B.; MORENOC, C.; GÁMEZ, L.; TRUCHUELO, M. *Neurofibromatosis-Noonan syndrome: Case report and clinicopathogenic review of the Neurofibromatosis-Noonan syndrome and RAS-MAPK pathway*. **Dermatology Online Journal**, v.17, n.4, 2011.

RICCARDI, V. M. **Neurofibromatosis: Phenotype, Natural History, and Pathogenesis**, Second Edition, Baltimore and London: The Johns Hopkins University Press, 1992.

RICCARDI, V. M.; EICHNER, J. E. *Neurofibromatosis, phenotype, natural history, and pathogenesis*. **Baltimore and London: The John Hopkins University Press**, 1986.

RICHARDS, S.; AZIZ, N.; BALE, S.; BICK, D.; DAS, S.; GASTIER-FOSTER, J.; GRODY, W. W.; HEGDE, M.; LYON, E.; SPECTOR, E.; VOELKERDING, K.; REHM, H. L. *Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation on the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology*. **Genetics in Medicine**, v.17, p.405-423. 2015.

RIELEY, M. B.; STEVENSON, D. A.; VISKOCHIL, D. H.; TINKLE, B. T.; MARTIN, L. J.; SCHORRY, E. K. *Variable expression of neurofibromatosis 1 in monozygotic twins*. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v.3, p.478 – 485, 2011.

RILEY, B. D.; CULVER, J. O.; SKRZY尼亚, C.; SENTER, L. A.; PETERS, J. A.; COSTALAS, J. W.; CALLIF-DALEY, F.; GRUMET, S. C.; HUNT, K. S.; NAGY, R. S.; MCKINNON, W. C.; PETRUCCELLI, N. M.; BENNETT, R. L.; TREPANIER, A. M. *Essential elements of genetic cancer risk assessment, counseling, and testing: updated recommendations of the National Society of Genetic Counselors*. **Journal of Genetic Counseling**, v.21, p.151-161, 2012.

RODRIGUES, L. O. C.; BATISTA, P. B.; GOLONI-BERTOLLO, E. N.; SOUZA-COSTA, D.; ELIAM, L.; ELIAM, M.; CUNHA, K. S. G.; DARRINGO-JUNIOR, L. G. *et al*. Neurofibromatoses: part 1- diagnosis and differential diagnosis. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v.72, n.3, p.241-250, 2014.

ROUX, P. P.; BLENIS, J. *ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. **Microbiology and Molecular Biology Reviews***, v.68, p.320–344, 2004.

SABBAGH, A.; PASMANT, E.; LAURENDEAU, I.; PARFAIT, B.; BARBAROT, S.; GUILLOT, B.; COMBEMALE, P.; FERKAL, S.; VIDAUD, M.; AUBOURG, P.; VIDAUD, D.; WOLKENSTEIN, P. *Unravelling the genetic basis of variable clinical expression in neurofibromatosis 1. **Human Molecular Genetics***, v.18, n.15, p.2768–2778, 2009.

SAGE J. *The retinoblastoma tumor suppressor and stem cell biology. **Genes Development***, v.26, p.1409–1420, 2012.

SANDERS, S. J.; MURTHA, M. T.; GUPTA, A. R.; MURDOCH, J. D.; RAUBESON, M. J.; WILLSEY, A. J.; *et al.* *De novo mutations revealed by whole-exome sequencing are strongly associated with autism. **Nature***, v.485, p.237-241, 2012.

SANGER, F.; COULSON, A. R. A Rapid Method for Determining Sequences in DNA by Primed Synthesis with DNA Polymerase. ***Journal of Molecular Biology***, v.94, p.441-448. 1975.

SAWADA, S.; FLORELL, S.; PURANDARE, S. M.; OTA, M.; STEPHENS, K.; VISKOCHIL, D. *Identification of NF1 mutations in both alleles of a dermal neurofibroma. **Nature Genetics***, v.14, p.110–112, 1996.

SCHMIDTKE, J.; SKIRTON, H.; NIPPERT, I.; WOLFF, G. *Genetic Counseling: Historical, Ethical, and Practical Aspects. **International Encyclopedia of the Social & Behavioral Sciences***, v.9, n.2, p.908-914, 2015.

SCHUBBERT, S.; SHANNON, K.; BOLLANG, G. *Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. **Nature Reviews Cancer***, v.7, p.295-308, 2007.

SERRA, E.; PUIG, S.; OTERO, D.; GAONA, A.; KRUYER, H.; ARS, E.; ESTIVILL, X.; LAZARO, C. *Confirmation of a double-hit model for the NF1 gene in benign neurofibromas. **The American Journal of Human Genetics***, v.61, p.512–519, 1997.

SHANNON, K. M.; O'CONNELL, P.; MARTIN, G. A.; PADERANGA, D.; OLSON K.; DINNDORF, P.; MCCORMICK, F. *Loss of the normal NF1 allele from the bone marrow of children with type 1 neurofibromatosis and malignant myeloid disorders. **The New England Journal of Medicine***, v.330, p.597–601, 1994.

SHERMAN, L. S.; ATIT, R.; ROSENBAUM, T.; COX, A. D.; RATNER, N. *Single cell RasGTP analysis reveals altered Ras activity in a subpopulation of neurofibroma Schwann cells but not fibroblasts. **The Journal of Biological Chemistry***, v.275, n.39, p.30740–30745, 2000.

SILVA, M. F. P. T. B.; MONTEIRO, R. F.; BORGES, A. M. F. S.; RIBEIRO, E. M. *Deficiências no Brasil: Conceito, história e aconselhamento genético. **Apae Ciência***, v.3, n.3, p.20-39, 2013.

SILVA, A. V.; CASALI-DA-ROCHA, J. C. Síndromes de câncer de mama e ovário hereditárias: o que fazer em 2015? **Revista Brasileira de Mastologia**, v.24, n.3, p.82-87, 2014.

SILVEIRA, R. V. M. **Breve história de um homem, do ensino e da genética no Brasil: Oswaldo Frota-Pessoa**. Genética na Escola, Sociedade Brasileira de Genética, p.31-33, 2006.

SIEMENS, João Udo. **Variedades lingüísticas entre os menonitas de Curitiba**. Dissestação (Mestrado), Universidade Católica do Paraná, 1983.

SKOLNICK, MARK H. *et al.* A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene *BRCA1*. **Science**, v. 266, n. 5172, p. 66-71, 1994.

SOKOLENKO, A. P.; BOGDANOVA, N.; KLUZNIAK, W.; PREOBRAZHENSKAYA, E. V.; KULIGINA, E. S.; IYEVLEVA, A. G.; ALEKSAKHINA, S. N.; MITIUSHKINA, N. V.; GORODNOVA, T. V.; BESSONOV, A. A.; TOGO, A. V.; LUBINSKI, J.; CYBULSKI, C.; JAKUBOWSKA, A, DÖRK, T.; IMYANITOV, E. N. *Double heterozygotes among breast cancer patients analyzed for BRCA1, CHEK2, ATM, NBN/NBS1, and BLM germ-line mutations*. **Breast Cancer Research and Treatment**, v.145, p.553-562, 2014.

SOLOMON, B. J.; WHITMAN, T.; WOOD, M. E. Contribution of extended family history in assessment of risk for breast and colon cancer. **BMC Family Practice**, v.17, p.126-130, 2016.

STATEN ISLAND UNIVERSITY HOSPITAL. **Sporadic vs. Hereditary Cancer**. Disponível em <<http://www.siu.edu/Our-Services/Clinical-Services/Cancer-Services/The-Hereditary-Cancer-Genetics-Program/Sporadic-vs-Hereditary-Cancer.aspx>> Acesso em: abril de 2016.

STORCHOVA, Z.; PELLMAN, D. *From polyploidy and aneuploidy, genome instability and cancer*. **Nature Review of the Molecular Cell Biology**, v.5, p.45-54, 2004.

STUMPF, D. A.; ALKSNE J. F.; BROWN, S. S. *Neurofibromatosis*. **Archives of Neurology**, v.45, p.575-578, 1987.

SUSPITSIN, E. N.; YANUS, G. A.; SOKOLENKO, A. P.; YATSYK, O. S.; ZAITSEVA, O. A.; BESSONOV, A. A.; IVANTSOV, A. O.; HEINSTEIN, V. A.; KLIMASHEVSKIY, V. F.; TOGO, A. V.; IMYANITOV, E. N. *Development of breast tumors in CHEK2, NBN/NBS1 and BLM mutation carriers does not commonly involve somatic inactivation of the wild-type allele*. **Medical Oncology**, v.31, p. 828, 2014.

SZUDEK, J.; BIRCH, P.; RICCARDI, V. M.; EVANS, D. G.; FRIEDMAN, J. M. *Associations of clinical features in neurofibromatosis 1 (NF1)*. **Genetic Epidemiology**, v.19, n.4, p.429-439, 2000.

SZUDEK, J.; JOE, H.; FRIEDMAN, J. M. *Analysis of intrafamilial phenotypic variation in neurofibromatosis 1 (NF1)*. **Genetic Epidemiology**, v.23, n.2, p.150-164, 2002.

TADIBOYINA, V. T.; RUPAR, A.; ATKISON, P.; FEIGENBAUM, A.; KRONICK, J.; WANG, J.; HEGELE, R. A. *Novel mutation in DGUOK in hepatocerebral mitochondrial DNA depletion syndrome associated with cystathioninuria. American Journal of Medical Genetics Part A*, v.135A, p.289–291, 2005.

TANAKA, K.; ABE, M.; SATO, Y. *Roles of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase in the signal transduction of basic fibroblast growth factor in endothelial cells during angiogenesis. Japanese Journal of Cancer Research*, v.90, p.647–654, 1999.

THIEL, C.; WILKEN, M.; ZENKER, M., STICHT, H.; FAHSOLD, R.; GUSEK-SCHNEIDER, G. C.; RAUCH, A. *Independent NF1 and PTPN11 mutations in a family with neurofibromatosis-Noonan syndrome. American Journal of Medical Genetics Part A*, v.49, n.6, p.1263-7, 2009.

THIESSEN, Jack. *Mennonite Low German Dictionary. Mennonotisch Plattdeutsches Wörterbuch Max Kade Institute for German-American Studies University of Wisconsin*, 2003.

THOMSON, S. A.; WALLACE, M. R. *RT-PCR splicing analysis of the NF1 open reading frame. Human Genetics*, v.110, n.5, p.495–502, 2002.

THOMPSON, E. R.; DOYLE, M. A.; RYLAND, G. L.; ROWLEY, S. M.; CHOONG, D. Y.; TOTHILL, R. W.; THORNE, H.; CONFAB, K.; BARNES, D. R.; LI, J.; ELLUL, J.; PHILIP, G. K.; ANTILL, Y. C.; JAMES, P. A.; TRAINER, A. H.; MITCHELL, G.; CAMPBELL, I. G. *Exome sequencing identifies rare deleterious mutations in DNA repair genes FANCC and BLM as potential breast cancer susceptibility alleles. PLoS Genetics*, v.8, n.9, e1002894, 2012.

TIDYMAN, W. E.; RAUEN, K. A.; *Expansion of the RASopathies. Current Genetic Medicine Reports*, v.4, p.57-64, 2016.

TREPANIER, A.; AHRENS, M.; MCKINNON, W.; PETERS, J.; STOPFER, J.; GRUMET, S. C.; *et al. Genetic cancer risk assessment and counseling: recommendations of the National Society of Genetic Counselors. Journal of Genetic Counseling*, v.13, n.2, p.83-114, 2004.

TROTTER, K. W.; ARCHER, T. K. *The BRG1 transcriptional coregulator. Nuclear receptor signaling 6. The Open Access Journal of the Nuclear Receptor Signaling Atlas*, 2008.

TROVÓ-MARQUI, A. B., TAJARA, E. H. *Neurofibromin: a general outlook. Clinical Genetics*, v.70, p.1-13, 2006.

TUNG, N. BATTELLI, C.; ALLEN, B.; KALDATE, R.; BHATNAGAR, S.; BOWLES, K.; TIMMS, K.; GARBER, J. E.; HEROLD, C.; ELLISEN, L.; KREJDOVSKY, J.; DELEONARDIS, K.; SEDGWICK, K.; SOLTIS, K. ROA, B.; WENSTRUP, R. J.; HARTMAN, A. R. *Frequency of mutations in individuals with breast cancer referred for BRCA1 and BRCA2 testing using next-generation sequencing with a 25-gene panel. Cancer*, v.121, n. 1, p.25–33, 2015.

TYRER, J.; DUFFY, S. W.; CUZICK, J. *A breast cancer prediction model incorporating familial and personal risk factors. **Statistics in Medicine**, v.23, p.1111-1130, 2004*

UHLIK, M. T.; ABELL, A. N.; JOHNSON, N. L.; SUN, W.; CUEVAS, B. D.; LOBELRICE, K. E.; HORNE, E. A.; DELL'ACQUA, M. L.; JOHNSON, G. L. *Rac-MEKK3-MKK3 scaffolding for p38 MAPK activation during hyperosmotic shock. **Nature Cell Biology**, v.5, p.1104–1110, 2003.*

UPADHYAYA, M.; COOPER, D. N. *Neurofibromatosis Type 1 from Genotype to Phenotype, **Oxford: BIOS Scientific Publishers Limited**, 1998.*

VAN ASPEREN, C. J.; BROHET, R. M.; MEIJERS-HEIJBOER, E. J.; HOOGERBRUGGE, N.; VERHOEF, S. VASEN, H. F. A.; AUSEMS, M. G. E. M.; MENKO, F. H.; GOMEZ GARCIA, E. B.; KLIJN, J. G. M.; HOGERVORST, F. B. L.; VAN HOUWELINGEN, J. C.; VAN'T VEER, L. J.; ROOKUS, M. A.; VAN LEEUWEN, F. E. NETHERLANDS COLLABORATIVE GROUP ON HEREDITARY BREAST CANCER. *Cancer risks in BRCA2 families: estimates for sites other than breast and ovary. **Journal of Medical Genetics**, v.42, p.711-719, 2005.*

VANDENBROUCKE, I.; VANDESOMPELE, J.; DE PAEPE, A.; MESSIAEN, L. *Quantification of NF1 transcripts reveals novel highly expressed splice variants. **FEBS Letters**, v.522, p.71–76, 2002.*

VIEIRA, D. S. C.; DUFLOTH, R.M.; SCHMITT, F.C.L.; ZEFERINO, L.C. *Carcinoma de mama: novos conceitos na classificação. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.30, n.1, p.42-47, 2008.*

VISSERS, L. E. L. M.; BONETTI, M.; OVERMAN, J. P.; NILLESEN, W. M.; FRINTS, S. G. M.; LIGT, J.; ZAMPINO, G.; JUSTINO, A.; MACHADO, J. C.; SCHEPENS, M.; BRUNNER, H. G.; VELTMAN, J. A.; SCHEFFER, H.; GROS, P.; COSTA, J. L.; TARTAGLIA, M.; VAN DER BURGT, I.; YNTEMA, H. G.; DER HERTOEG, J. *Heterozygous germline mutation in A2ML1 are associated with a disorder clinically related to Noonan syndrome. **European Journal of Human Genetics**, v.23, p.317-324, 2015.*

VRIES, Y.; LWIWSKI, N.; LEVITUS, M.; KUYT, B.; ISRAELS, S. J.; ARWERT, F.; ZWAAN, M.; GREENBERG, C. R.; ALTER, B. P.; JOENJE, H.; MEIJERS-HEIJBOER, H. *A dutch Fanconi Anemia FACC founder mutation in canadian Manitoba Mennonites. **Anemia, Hindawi Publishing Corporation**, p.1-6.2012.*

XU, G. F.; O'CONNELL, P.; VISKOCHIL, D.; CAWTHON, R.; ROBERTSON, M.; CULVER, M.; DUNN, D.; STEVENS, J.; GESTELAND, R.; WHITE, R.; WEISS, R. *The neurofibromatosis type 1 gene encodes a protein related to GAP. **Cell**, v.62, n.3, p.599–608, 1990.*

XU, W.; MULLIGAN, L. M.; PONDER, M. A.; LIU, L.; SMITH, B. A.; MATHEW, C. G.; PONDER, B. A. *Loss of NF1 alleles in pheochromocytomas from patients with type 1 neurofibromatosis. **Genes, Chromosomes and Cancer**, v.4, p.337–342, 1992.*



XU, H.; GUTMANN, D. H. *Mutations in the GAP-related domain impair the ability of neurofibromin to associate with microtubules.* **Brain Research**, v.759, n.1, p.149–152, 1997.

WU, G.; LUO, J.; RANA, J. S.; LAHA, M. R.; SELLKE, F. W.; Li, J. *Involvement of COX-2 in VEGF-induced angiogenesis via P38 and JNK pathways in vascular endothelial cells.* **Cardiovascular Research**, v.69, p.512–519, 2006.

WALSH, T.; KING, M. C. *Ten genes for inherited breast cancer.* **Cancer Cell**, v.11, p.103-105, 2007.

WANG, Y.; CORTEZ, D.; YAZDI, P.; NEFF, N.; ELLEDGE, S. J.; QIN, J. *BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repairs of aberrant DNA structures.* **Genes & Development**, v.14, p.927-939, 2000.

WANG, W.; COTE, J.; XUE, Y.; ZHOU, S.; KHAVARI, P. A.; BIGGAR, S. R.; MUCHARDT, C.; KALPANA, G. V.; GOFF, S. P.; YANIV, M. *et al. Purification and biochemical heterogeneity of the mammalian SWI-SNF complex.* **The EMBO Journal**, v.15, n.19, p.5370-5382, 1996.

WANG, W.; NIENDORF, K. B.; PATEL, D.; BLACKFORD, A.; MARRONI, F.; SOBER, A. J.; PARMIGIANI, G.; TSAO, H. *Estimating CDKN2A carrier probability and personalizing cancer risk assessments in hereditary melanoma using MelaPRO.* **Molecular and Cellular Pathobiology**, v.70, n.2, p.552-559, 2010.

WEINBERG, R. A. *The retinoblastoma protein and cell cycle control.* **Cell**, v.81, p.323-330, 1995.

WEINBERG, R.A. **A biologia do Câncer.** Porto Alegre: ARTMED, 2008.

WEISS, B.; BOLLAG, G.; SHANNON, K. *Hyperactive Ras as a therapeutic target in neurofibromatosis type 1.* **American Journal of Medical Genetics**, v.89, n.1, p. 14–22, 1999.

WELCSH, P. L.; KING, M. C. *BRCA1 and BRCA2 and the genetics of breast and ovarian cancer.* **Human Molecular Genetics**, v.10, n.7, p.705-713, 2001.

WOOSTER, R.; BIGNEL, G.; LANCASTER, J.; SWIFT, S.; SEAL, S.; MANGION, J.; COLLINS, N.; GREGORY, S.; GUMBS, C.; MICKLEM, G. *et al. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2.* **Nature**, v.378, p.789–792, 1995.

WU, C. H.; FALLINI, C.; TICOZZI, N.; KEAGLE, P.J.; SAPP, P.C.; PIOTROWSKA, K.; *et al. Mutations in the profilin 1 gene cause familial amyotrophic lateral sclerosis.* **Nature**, v.488, p.499-503, 2012.

YANG, Y.; MUZNY, D. M.; REID, J.; BAINBRIDGE, M. N.; WILLIS, A.; WARD, P. A.; *et al. Clinical whole-exome sequencing for the diagnosis of mendelian disease.* **The New England Journal of Medicine**, v.369, p.1502-1511, 2013.

YANG, Y.; MUZNY, D. M.; XIA, F.; NIU, Z.; PERSON, R.; DING, Y.; *et al.* *Molecular findings among patients referred for clinical whole-exome sequencing. The Journal of the American Medical Association*, v.312, n.18, p.1870-1879, 2014.

YANG, C.; ARNOLD, A. G.; TROTTIER, M.; SONODA, Y.; ABU-RUSTUM N. R.; ZIVANOVIC, O.; ROBSON, M. E.; STADLER, Z. K.; WALSH, M. F.; HYMAN, D. M.; OFFIT, K.; ZHANG, L. *Characterization of a novel germline PALB2 duplication in a hereditary breast and ovarian cancer family. Breast Cancer Research and Treatment*, v.160, n.3, p.447-456, 2016.

ZENKER, M. *Clinical manifestations of mutations in RAS and related intracellular signal transduction factors. Current Opinion in Pediatrics*, v. 23, p.443–451, 2011.

ZHU, Y.; GHOSH, P.; CHARNAY, P.; BURNS, D. K.; PARADA, L. F. *Neurofibromas in NF1: Schwann cell origin and role of tumor environment. Science*, v.296, n.5569, p.920–922, 2002.

## APÊNDICE A - QUESTIONÁRIO DE ACONSELHAMENTO GENÉTICO EM CÂNCER

(Elaborado a partir do modelo utilizado no Aconselhamento Genético da Oncoclínica em Curitiba, PR)

### Entrevista

Data:

Horário:

Entrevistador:

### Identificação

Local:

Número de identificação da família:

Nome do entrevistado:

Tempo na Colônia de Witmarsum (PR):

Contato:

### Dados do Paciente

1. Qual a sua data de nascimento?
2. Qual a sua idade?
3. Sexo:  Feminino  Masculino
4. O(a) Sr. (a) nasceu no Brasil?  Sim  Não
5. Onde o(a) Sr.(a) nasceu? (Cidade, estado, país).
6. Qual o seu grau de instrução?
  - Analfabeto
  - Educação infantil
  - Antigo primário completo ou incompleto ou antigo ginásio / antigo 1º grau / ensino fundamental incompleto
  - Antigo ginásio / antigo 1º grau / ensino fundamental completo

( ) Antigo 2º grau / antigo científico / antigo clássico / normal / técnico / ensino médio incompleto

( ) Antigo 2º grau / antigo científico / antigo clássico / normal / técnico / ensino médio completo

( ) Superior incompleto

( ) Superior completo

( ) Não sabe

**7.** Qual é a sua situação conjugal?

**8.** O(a) Sr.(a) tem ou já teve algum diagnóstico de câncer ou tumor maligno dado pelo médico?

( ) Sim ( ) Não ( ) Não sabe

**9.** Quantos diagnósticos de câncer ou tumor maligno dados pelo médico o(a) Sr.(a) já teve?

**10.** Em que parte do corpo o câncer ou tumor maligno começou? (Entrevistador: Se houver mais de um primário, descreva o mais recente.)

**11.** Qual era o tipo deste câncer ou tumor maligno? Por exemplo, melanoma, sarcoma, carcinoma, adenocarcinoma etc.

Tipo:

Marcadores:

(Entrevistador: Pergunte primeiro o ano de diagnóstico de cada tipo de tumor; se o entrevistado não souber o ano pergunte a idade ao diagnóstico.)

**12.** Em que ano ele foi diagnosticado?

**13.** Quantos anos o(a) Sr.(a) tinha quando ele foi diagnosticado?

**14.** O(a) Sr.(a) teve algum outro tipo de câncer ou tumor maligno, que tenha começado em outra parte do corpo, e sem estar relacionado com o anterior?

( ) Sim ( ) Não ( ) Não sabe

(Entrevistador: Descreva o segundo mais recente.)

**15.** Em que parte do corpo este câncer ou tumor maligno começou?

**16.** Qual era o tipo deste câncer ou tumor maligno?

17. Em que ano ele foi diagnosticado?

18. Quantos anos o(a) Sr.(a) tinha quando ele foi diagnosticado?

19. O(a) Sr.(a) teve algum tipo de tumor benigno diagnosticado pelo médico?

( ) Sim      ( ) Não      ( ) Não sabe

20. Qual o tipo, quantos e em que ano ou com que idade os tumores benignos foram diagnosticados?

(Entrevistador: Pergunte primeiro o ano de diagnóstico da primeira lesão de cada tipo de tumor benigno; se o entrevistado não souber o ano pergunte a idade do diagnóstico.)

- Cistos no rim:

- Pólipos intestinais:

- Tumores da glândula suprarrenal:

- Tumor de pâncreas:

- Tumores da hipófise:

- Tumores do osso:

- Tumor de tireóide:

- Meningeoma:

- Mioma:

- Lipomas:

- Lesões benignas de mama:

- Tumor de cerebelo:

- Outros:

### História Familiar

21. Você nasceu de uma gravidez de gêmeos?

( ) Sim      ( ) Não      ( ) Não sabe

As próximas perguntas são sobre o histórico da sua família. Por favor, inclua apenas os parentes de sangue, excluindo os adotivos.

**22.** Você é adotado?

Sim     Não     Não sabe

**23.** Os seus pais são aparentados de sangue?

Sim     Não     Não sabe

\*Agora gostaria de saber sobre seus pais.

**24.** Qual o nome completo da sua **mãe**?

**25.** É menonita?  Sim     Não     Não sabe

**26.** Ela ainda está viva?  Sim     Não     Não sabe

**27.** Idade atual ou de falecimento:

**28.** Qual foi o motivo do falecimento?

**29.** Ela tem ou já teve algum diagnóstico de câncer ou tumor maligno dado pelo médico?

Sim     Não     Não sabe

**30.** Quantos diagnósticos de câncer ou tumor maligno dados pelo médico ela já teve?

**31.** Em que parte do corpo o câncer ou tumor maligno começou?

**32.** Qual era o tipo deste câncer ou tumor maligno?

**33.** Em que ano ele foi diagnosticado?

**34.** Quantos anos sua mãe tinha quando ele foi diagnosticado?

**35.** Ela teve algum outro tipo de câncer ou tumor maligno, que tenha começado em outra parte do corpo, e sem estar relacionado com o anterior?

Sim     Não     Não sabe

**36.** Em que parte do corpo este câncer ou tumor maligno começou?

**37.** Qual era o tipo deste câncer ou tumor maligno?

**38.** Em que ano ele foi diagnosticado?

39. Quantos anos sua mãe tinha quando ele foi diagnosticado?
40. Qual o nome completo do seu **pai**?
41. É menonita? ( ) Sim ( ) Não ( ) Não sabe
42. Ele ainda está vivo? ( ) Sim ( ) Não ( ) Não sabe
43. Idade atual ou de falecimento:
44. Qual foi o motivo do falecimento?
45. Ele tem ou já teve algum diagnóstico de câncer ou tumor maligno dado pelo médico?
- ( ) Sim ( ) Não ( ) Não sabe
46. Quantos diagnósticos de câncer ou tumor maligno dados pelo médico ele já teve?
47. Em que parte do corpo o câncer ou tumor maligno começou?
48. Qual era o tipo deste câncer ou tumor maligno?
49. Em que ano ele foi diagnosticado?
50. Quantos anos seu pai tinha quando ele foi diagnosticado?
51. Ele teve algum outro tipo de câncer ou tumor maligno, que tenha começado em outra parte do corpo, e sem estar relacionado com o anterior?
- ( ) Sim ( ) Não ( ) Não sabe
52. Em que parte do corpo este câncer ou tumor maligno começou?
53. Qual era o tipo deste câncer ou tumor maligno?
54. Em que ano ele foi diagnosticado?
55. Quantos anos seu pai tinha quando ele foi diagnosticado?

\*Agora gostaria de saber sobre os seus avós. Vou começar com seus avós maternos (mãe e pai da sua mãe) e depois perguntarei pelos seus avós paternos (mãe e pai do seu pai).

**56.** Qual o nome completo da sua **avó materna**?

**57.** Qual a origem étnica da sua avó materna?

Nativa

Européia latina

Européia não latina

Negra

Árabe

Judia Ashkenazi

Judia Sefardita

Judia, outro

Oriental

Outro

Não sabe

**58.** É menonita?  Sim  Não  Não sabe

**59.** Ela nasceu no Brasil?  Sim  Não  Não sabe

**60.** Se não, em que país ela nasceu?

**61.** Ela ainda está viva?  Sim  Não  Não sabe

**62.** Idade atual ou de falecimento:

**63.** Qual foi o motivo do falecimento?

**64.** Ela tem ou já teve algum diagnóstico de câncer ou tumor maligno dado pelo médico?  Sim  Não  Não sabe

**64.** Quantos diagnósticos de câncer ou tumor maligno dados pelo médico ela já teve?

**66.** Em que parte do corpo o câncer ou tumor maligno começou?

**67.** Qual era o tipo deste câncer ou tumor maligno?

**68.** Em que ano ele foi diagnosticado?

**69.** Quantos anos a sua avó materna tinha quando ele foi diagnosticado?



**70.** Ela teve algum outro tipo de câncer ou tumor maligno, que tenha começado em outra parte do corpo, e sem estar relacionado com o anterior?

Sim     Não     Não sabe

**71.** Qual era o tipo deste câncer ou tumor maligno? Ano e idade de diagnóstico?

**72.** Qual o nome completo de seu **avô materno**?

**73.** Qual a origem étnica de seu avô materno?

Nativa

Européia latina

Européia não latina

Negra

Árabe

Judia Ashkenazi

Judia Sefardita

Judia, outro

Oriental

Outro

Não sabe

**74.** É menonita?  Sim     Não     Não sabe

**75.** Ele nasceu no Brasil?  Sim     Não     Não sabe

**76.** Se não, em que país ele nasceu?

**77.** Ele ainda está viva?  Sim     Não     Não sabe

**78.** Qual a idade atual ou de falecimento?

**79.** Qual foi o motivo do falecimento?

**80.** Ele tem ou já teve algum diagnóstico de câncer ou tumor maligno dado pelo médico?  Sim     Não     Não sabe

**81.** Quantos diagnósticos de câncer ou tumor maligno dados pelo médico ele já teve?

**82.** Em que parte do corpo o câncer ou tumor maligno começou?

**83.** Qual era o tipo deste câncer ou tumor maligno?

**84.** Em que ano ele foi diagnosticado?

**85.** Quantos anos seu avô materno tinha quando foi diagnosticado?

**86.** Ele teve algum outro tipo de câncer ou tumor maligno, que tenha começado em outra parte do corpo, e sem estar relacionado com o anterior?

( ) Sim      ( ) Não      ( ) Não sabe

**87.** Qual era o tipo deste câncer ou tumor maligno? Ano e idade de diagnóstico?

**88.** Qual o nome completo da sua **avó paterna**?

**89.** Qual a origem étnica da sua avó paterna?

( ) Nativa

( ) Européia latina

( ) Européia não latina

( ) Negra

( ) Árabe

( ) Judia Ashkenazi

( ) Judia Sefardita

( ) Judia, outro

( ) Oriental

( ) Outro

( ) Não sabe

**90.** É menonita? ( ) Sim      ( ) Não      ( ) Não sabe

**91.** Ela nasceu no Brasil? ( ) Sim      ( ) Não      ( ) Não sabe

**92.** Se não, em que país ela nasceu?

93. Ela ainda está viva? ( ) Sim ( ) Não ( ) Não sabe
94. Qual a idade atual ou de falecimento?
95. Qual foi o motivo do falecimento?
96. Ela tem ou já teve algum diagnóstico de câncer ou tumor maligno dado pelo médico? ( ) Sim ( ) Não ( ) Não sabe
97. Quantos diagnósticos de câncer ou tumor maligno dados pelo médico ela já teve?
98. Em que parte do corpo o câncer ou tumor maligno começou?
99. Qual era o tipo deste câncer ou tumor maligno?
100. Em que ano ele foi diagnosticado?
101. Quantos anos a sua avó materna tinha quando ele foi diagnosticado?
102. Ela teve algum outro tipo de câncer ou tumor maligno, que tenha começado em outra parte do corpo, e sem estar relacionado com o anterior?
- ( ) Sim ( ) Não ( ) Não sabe
103. Qual era o tipo deste câncer ou tumor maligno? Ano e idade de diagnóstico?
104. Qual o nome completo de seu **avô paterno**?
105. Qual a origem étnica de seu avô paterno?
- ( ) Nativa
- ( ) Européia latina
- ( ) Européia não latina
- ( ) Negra
- ( ) Árabe
- ( ) Judia Ashkenazi
- ( ) Judia Sefardita
- ( ) Judia, outro
- ( ) Oriental

( ) Outro

( ) Não sabe

**106.** É menonita? ( ) Sim ( ) Não ( ) Não sabe

**107.** Ele nasceu no Brasil? ( ) Sim ( ) Não ( ) Não sabe

**108.** Se não, em que país ele nasceu?

**109.** Ele ainda está vivo? ( ) Sim ( ) Não ( ) Não sabe

**110.** Qual a idade atual ou de falecimento?

**111.** Qual foi o motivo do falecimento?

**112.** Ele tem ou já teve algum diagnóstico de câncer ou tumor maligno dado pelo médico? ( ) Sim ( ) Não ( ) Não sabe

**113.** Quantos diagnósticos de câncer ou tumor maligno dados pelo médico ela já teve?

**114.** Em que parte do corpo o câncer ou tumor maligno começou?

**115.** Qual era o tipo deste câncer ou tumor maligno?

**116.** Em que ano ele foi diagnosticado?

**117.** Quantos anos seu avô paterno tinha quando ele foi diagnosticado?

**118.** Ele teve algum outro tipo de câncer ou tumor maligno, que tenha começado em outra parte do corpo, e sem estar relacionado com o anterior?

( ) Sim ( ) Não ( ) Não sabe

**119.** Qual era o tipo deste câncer ou tumor maligno? Ano e idade de diagnóstico?

\*Agora gostaria que o (a) Sr. (a) falasse sobre suas filhas e seus filhos.

**120.** Quantas filhas o(a) Sr.(a) tem ou teve?

**121.** Quantos filhos o(a) Sr.(a) tem ou teve?

\*Sempre começando pelo indivíduo mais velho.

Nome	Está vivo(a)?	Idade atual ou de falecimento	Teve ou tem diagnóstico de câncer?	Tipo de câncer	Idade de diagnóstico	Quantos filhos e idades?

\*Agora gostaria que você falasse sobre suas irmãs e seus irmãos.

**122.** Quantas irmãs o(a) Sr.(a) tem ou teve?

**123.** Quantos irmãos o(a) Sr.(a) tem ou teve?

Nome	Está vivo(a)?	Idade atual ou de falecimento	Teve ou tem diagnóstico de câncer?	Tipo de câncer	Idade de diagnóstico	Quantos filhos e idades?

\*Agora gostaria que você falasse sobre suas meias-irmãs e seus meios-irmãos.

**124.** Quantas meias-irmãs o(a) Sr.(a) tem ou teve?

**125.** Quantos meios-irmãos o(a) Sr.(a) tem ou teve?

Nome	Está vivo(a)?	Idade atual ou de falecimento	Teve ou tem diagnóstico de câncer?	Tipo de câncer	Idade de diagnóstico	Quantos filhos e idades?

\*Agora gostaria que você falasse sobre seus tios e tias maternos (irmãos da sua mãe).

**126.** Quantas tias o(a) Sr.(a) tem ou teve?

**127.** Quantos tios o(a) Sr.(a) tem ou teve?

Nome	Está vivo(a)?	Idade atual ou de falecimento	Teve ou tem diagnóstico de câncer?	Tipo de câncer	Idade de diagnóstico	Quantos filhos e idades?

\*Agora gostaria que você falasse sobre seus tios e tias paternos (irmãos do seu pai).

**128.** Quantas tias o(a) Sr.(a) tem ou teve?

**129.** Quantos tios o(a) Sr.(a) tem ou teve?

Nome	Está vivo(a)?	Idade atual ou de falecimento	Teve ou tem diagnóstico de câncer?	Tipo de câncer	Idade de diagnóstico	Quantos filhos e idades?

### Fatores de Risco

**130.** Idade de menarca:

**131.** Número de gestações (incluir perdas):

**132.** Idade em que teve o primeiro filho:

**133.** Número de meses que amamentou (incluindo todas as gestações):

**134.** Uso de pílulas ou outro tipo de hormônio: ( ) Sim ( ) Não

**135.** Tempo de uso:

**136.** Ainda menstrua? ( ) Sim ( ) Não

**137.** Se não, parou naturalmente? ( ) Sim ( ) Não

**138.** Em que idade?

**139.** Peso atual:

**140.** Altura:

141. Tabagismo ( ) Sim ( ) Não
142. Se parou, há quanto tempo?
143. Etilismo ( ) Sim ( ) Não
144. Se parou, há quanto tempo?
145. Atividade física ( ) Sim ( ) Não
146. Qual?
147. Frequência

## APÊNDICE B – EXEMPLOS DE LAUDOS ENTREGUE ÀS FAMÍLIAS MENONITAS PARTICIPANTES

### B1. EXEMPLO DE LAUDO PARA EVIDÊNCIAS DE CÂNCER ESPORÁDICO

#### **Prezada Sr<sup>(a)</sup> Nome do probando**

Data de nascimento do probando

Estamos escrevendo este relatório para que o(a) senhor(a) tenha um resumo da avaliação genética que realizou como participante voluntário (a) do projeto de pesquisa intitulado “Levantamento de casos e análise genética da população Menonita com histórico de câncer familiar”. O objetivo desta avaliação é identificar pessoas e famílias Menonitas com risco aumentado para as formas genéticas de cânceres hereditários e assim auxiliar na identificação precoce e prevenção do câncer.

Quando o(a) senhor(a) foi entrevistado (a), em (data da visita), estava com XX anos e conversamos sobre sua história médica e familiar. Neste histórico, identificamos o seu caso pessoal de câncer de pele do tipo basocelular aos XX anos de idade e a identificação de pólipos intestinais benignos aos XX anos, seu pai falecido aos XX anos com histórico de câncer de pele do tipo basocelular por volta dos XX anos de idade, uma irmã com XX anos diagnosticada com um tumor benigno de tireóide, um irmão com XX anos diagnosticado com câncer cerebral aos XX anos de idade. Com este histórico, verificamos que não há indicativos de uma história familiar de câncer em sua família com características sugestivas para uma tendência genética para o desenvolvimento de tumores. Isso significa que no momento, as informações confirmadas sobre o número de casos de câncer, os tipos de câncer e as idades de aparecimento dos tumores em sua família não são suficientes para dizer que o(a) senhor(a) ou sua família tenham maior risco para a forma hereditária deste tipo de câncer. De acordo com a nossa análise, os cálculos de risco para cânceres hereditários tais como os de mama, ovário, cólon, endométrio, pâncreas e melanoma estão no mesmo nível da população em geral. Sendo assim, não há, neste momento, motivo para realizar uma investigação genética adicional. Qualquer mudança na



história de sua família como o diagnóstico de algum tipo de câncer, pode mudar essa avaliação, e deve ser comunicada ao grupo de Aconselhamento Genético que procederá a novos cálculos.

Como qualquer paciente nesta faixa de idade, é aconselhável continuar realizando as medidas para detecção precoce do câncer: (1) auto-exame das mamas a cada mês e (2) exame preventivo do câncer de colo de útero e (3) mamografia anualmente. É importante (4) introduzir e manter em sua rotina exercícios físicos ao menos por 4 horas semanais e (5) uma dieta rica em fibras com baixa quantidade de gorduras animais, já que estes são fatores reconhecidamente protetores para ocorrência de câncer de mama. Além disso, é importante (6) evitar a exposição desnecessária a hormônios, o que pode aumentar o risco para câncer de mama.

Agradecemos a participação do(a) Senhor(a) na nossa pesquisa e nos colocamos à disposição para eventuais esclarecimentos pessoalmente ou pelo e-mail: [enilzeribeiro@gmail.com](mailto:enilzeribeiro@gmail.com)

Atenciosamente,



**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Enilze M. S. F. Ribeiro**  
**Geneticista - CRM 7861**

## B2. EXEMPLO DE LAUDO PARA EVIDÊNCIAS DE CÂNCER HEREDITÁRIO

### **Prezada Sr<sup>(a)</sup> Nome do probando**

Data de nascimento do probando

Estamos escrevendo este relatório para que o(a) senhor(a) tenha um resumo da avaliação genética que realizou como participante voluntária do projeto de pesquisa intitulado “Levantamento de casos e análise genética da população Menonita com histórico de câncer familiar”. O objetivo desta avaliação é identificar pessoas e famílias Menonitas com risco aumentado para as formas genéticas de cânceres hereditários e assim auxiliar na identificação precoce e prevenção do câncer.

Quando o(a) senhor(a) foi entrevistado(a), em (data da visita), estava com XX anos e conversamos sobre sua história médica e familiar. Neste histórico, identificamos o seu caso pessoal de câncer de mama (carcinoma ductal invasivo, receptores hormonais positivos e HER2 positivo) aos XX anos de idade, tratado com mastectomia da mama afetada, quimioterapia e Tamoxifeno por cinco anos. Além do seu caso pessoal, identificamos vários episódios de câncer de pele em sua mãe: melanoma maligno aos XX anos, carcinoma epidermóide aos XX e basocelular aos XX. Ainda no lado materno, uma tia apresentou câncer de mama aos XX anos (faleceu aos XX), e dois tios tiveram câncer de próstata, aos XX e XX anos de idade respectivamente. O avô paterno foi diagnosticado com câncer de próstata aos XX anos. Com este histórico, verificamos que há indicativos de uma história familiar de câncer em sua família com características sugestivas para uma tendência genética para o desenvolvimento de tumores, em especial a Síndrome de Câncer de Mama e Ovário hereditários (HBOC). Cerca de 40% destes casos hereditários se devem a mutações em um dos genes denominados *BRCA* (1 ou 2). Sugerimos que, se for de seu interesse e vontade, que esta avaliação genética seja realizada pelo nosso grupo, após sua autorização expressa através da assinatura de um consentimento.

Enquanto aguardamos o resultado do teste genético, recomendamos que você continue com seu acompanhamento médico normalmente. Havendo qualquer alteração na história de sua família ou

mesmo em você, como o diagnóstico de algum tipo de câncer, esta deve ser comunicada à equipe de Aconselhamento Genético.

Agradecemos a participação da Senhora na nossa pesquisa e nos colocamos à disposição para eventuais esclarecimentos pessoalmente ou pelo e-mail: enilzeribeiro@gmail.com

Atenciosamente,

A handwritten signature in black ink that reads "Enilze Ribeiro". The signature is written in a cursive, flowing style.

**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Enilze M. S. F. Ribeiro**  
**Geneticista - CRM 7861**

## **APÊNDICE C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

### **C1. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO 1**

Nós, Prof<sup>as</sup> Enilze M. S. F. Ribeiro e Angelica B. W. Boldt, da Universidade Federal do Paraná, estamos convidando você, pertencente a uma família Menonita com histórico de câncer familiar, a participar de um estudo intitulado LEVANTAMENTO DE CASOS E ANÁLISE GENÉTICA DA POPULAÇÃO MENONITA COM HISTÓRICO DE CÂNCER FAMILIAR. A comunidade Menonita no Brasil tem sofrido psicologicamente e economicamente com perdas de entes queridos, acometidos por câncer. Dentre estes, muitos ainda jovens, pertencem a famílias que relatam repetições deste evento em várias gerações. Até o momento, não foi realizada nenhuma investigação para levantar o número de casos e dos tipos de câncer que estão afetando a comunidade, tampouco foi realizado um estudo e um aconselhamento genético das famílias acometidas. Chamamos de aconselhamento genético todo o processo de informação, desde o conhecimento do que é esta doença, a identificação de suas causas, medidas para evitar um novo câncer em pessoa já afetada ou o primeiro em seus familiares.

O objetivo desta pesquisa é, portanto, identificar fatores genéticos de predisposição ao câncer hereditário (isto é, se existem fatores que aumentam a chance de aparecimento de câncer) em relação à sua pessoa e outros membros de sua família que assim desejarem, os quais serão utilizados para fins de pesquisa científica e para futuro aconselhamento genético em câncer àqueles que voluntariamente se dispuserem a participar da pesquisa.

Caso você participe da pesquisa, será necessário descrever a história de sua família, através de respostas a questionários que serão aplicados pessoalmente por membros da equipe. Para tanto, você receberá uma visita de membros da equipe em seu domicílio, ou, caso prefira, deverá comparecer no Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética (Departamento de Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Centro Politécnico, Av. Coronel Francisco Heráclito dos Santos, nº 210, Jardim das Américas, Curitiba, PR), para ser entrevistado por aproximadamente 40 minutos.

É possível que você experimente algum desconforto, principalmente relacionado ao fornecimento de informações pessoais. Um risco relacionado a esta etapa do estudo, pode ser o sofrimento psicológico associado à evocação de lembranças dolorosas, relacionadas a entes queridos ou a sua própria história pessoal. Você nunca será pressionado para responder a perguntas que considerar altamente desconfortável.

Participante da Pesquisa e/ou Responsável Legal \_\_\_\_\_

Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE \_\_\_\_\_

Orientadores (Enilze M. S. F. Ribeiro) \_\_\_\_\_

(Angelica B. Winter Boldt) \_\_\_\_\_

Os benefícios esperados com essa pesquisa são a caracterização da população Menonita do Brasil, inclusive os membros de sua família, quando estes assim o desejarem, quanto ao risco de desenvolver um câncer hereditário. Tais informações poderão diretamente auxiliar a identificar indivíduos em risco, acompanhar e a tratar diferencialmente sua pessoa e seus familiares, assim como outros pacientes. Embora nem sempre você seja diretamente beneficiado com o resultado da pesquisa, a sua participação poderá contribuir para o avanço científico.

Os pesquisadores Prof<sup>as</sup> Enilze M. S. F. Ribeiro e Angelica B. W. Boldt, responsáveis por este estudo, poderão ser localizados no Departamento de Genética do Setor de Ciências Biológicas (Universidade Federal do Paraná, Centro Politécnico, Jardim das Américas, Curitiba, PR), no e-mail enilzeribeiro@gmail.com e angelicaboldt@gmail.com, respectivamente, telefone (041) 3361-1555 e (041) 3361-1553, respectivamente, no horário comercial (8-12:00; 14-18:00), para esclarecer eventuais dúvidas que o/a senhor/a possa ter e fornecer-lhe as informações que queira, antes, durante ou depois de encerrado o estudo.

Optando por participar, um profissional do grupo de pesquisa, com treinamento em Aconselhamento Genético estará à sua disposição para esclarecer dúvidas, devendo ficar ciente de que, além dos membros da equipe de saúde, seus registros médicos poderão ser consultados pelo Comitê de Ética e pelo grupo de pesquisadores, porém, com a garantia de que **seu nome jamais será revelado**, ainda que os dados sejam, eventualmente, utilizados para propósitos educativos ou de publicações científicas, que ocorrerão independentemente dos resultados obtidos. A sua participação neste estudo é voluntária e se [o senhor | a senhora | você] não quiser mais fazer parte da pesquisa poderá desistir a qualquer momento e solicitar que lhe devolvam este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido assinado. O material obtido (questionários) será utilizado unicamente para essa pesquisa e será

destruído/descartado ao término do estudo, dentro de 5 anos. As despesas necessárias para a realização da pesquisa [transporte, acomodação e alimentação da equipe, etc] não são de sua responsabilidade e [o senhor | a senhora | você] não receberá qualquer valor em dinheiro pela sua participação.

Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome, e sim um código.

Participante da Pesquisa e/ou Responsável Legal \_\_\_\_\_

Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE \_\_\_\_\_

Orientadores (Enilze M. S. F. Ribeiro) \_\_\_\_\_

(Angelica B. Winter Boldt) \_\_\_\_\_

Caso seja identificado um risco de câncer hereditário, você e seus familiares poderão ser convidados a realizar uma segunda avaliação genética junto ao Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética, com coleta de sangue e assinatura de um segundo documento de esclarecimento. Não desejando fazer parte desta segunda etapa, seus dados serão utilizados somente para o levantamento de casos, sem nenhum prejuízo aos benefícios advindos desta primeira fase.

Desejando participar do estudo, o que se dará de forma voluntária e sem qualquer ônus e/ou remuneração financeira, você deverá assinar este termo de consentimento informado e esclarecido, reconhecendo que teve pleno conhecimento do seu teor e da sua finalidade.

Agradecemos sua atenção e consideramos louvável sua participação em nossos esforços para ajudar os pacientes acometidos pelo câncer.

Concordando em participar do estudo, declaro, para todos os fins de direito e a quem interessar possa, que:

- Li e recebi uma cópia deste termo de consentimento (TCLE);
- Entendi todas as informações nele contidas, tendo a oportunidade de fazer perguntas e esclarecer dúvidas sobre os testes, os procedimentos, os riscos associados e as alternativas.

- Estou ciente de que poderei ser convidado no futuro a ser submetido(a) a exames de sangue adicionais, e não receberei qualquer compensação monetária por minha participação neste estudo.

- Concordo, finalmente, em realizar esta etapa da análise genética, aceitando os riscos e os resultados.

Assim, por intermédio deste termo, ao lançar minha assinatura, dou meu livre e expreso consentimento para realização da pesquisa proposta.

Participante da Pesquisa e/ou Responsável Legal \_\_\_\_\_

Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE \_\_\_\_\_

Orientadores (Enilze M. S. F. Ribeiro) \_\_\_\_\_

(Angelica B. Winter Boldt) \_\_\_\_\_

Nome e assinatura do paciente  
atendimento

Data de nascimento/nº

Nome e assinatura do entrevistador

Curitiba, \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_\_.

Endereço para contato:

Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética

Departamento de Genética

Setor de Ciências Biológicas

Campus II - Centro Politécnico

Universidade Federal do Paraná

Caixa Postal 19071, CEP 81531-980.

Av. Coronel Francisco Heráclito dos Santos, nº 210

Jardim das Américas

Curitiba, PR

## C2. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO 2

Nós, Prof<sup>as</sup> Enilze M. S. F. Ribeiro (CRM/PR nº 7861) e Angelica B. Winter Boldt (Matr UFPR 203531), da Universidade Federal do Paraná, estamos convidando você, pertencente a uma família menonita com histórico de câncer familiar e identificado como tendo risco de câncer hereditário, a participar da segunda etapa de um estudo intitulado LEVANTAMENTO DE CASOS E ANÁLISE GENÉTICA DA POPULAÇÃO MENONITA COM HISTÓRICO DE CÂNCER FAMILIAR. A comunidade menonita no Brasil tem sofrido psiquicamente e economicamente com perdas de entes queridos, acometidos por câncer. Dentre estes, muitos ainda jovens, pertencem a famílias que relatam repetições geracionais deste evento. Até o momento, se desconhecem as possíveis causas genéticas do câncer nesta comunidade.

a) O objetivo desta etapa da pesquisa é identificar e analisar mutações nos genes de predisposição hereditária ao câncer por sequenciamento direto de DNA e analisar se existe e qual a contribuição de uma causa genética para a ocorrência de câncer na sua família.

b) Caso você participe da pesquisa, será necessário realizar a coleta de sangue para a análise dos genes. O teste genético, normalmente, requer 5 ml (cinco mililitros) de sangue periférico coletados de uma veia periférica do braço, através de material estéril, descartável e não reutilizável. Em raras situações, quando a primeira amostra não for suficiente ou adequada, você será chamado para realizar nova coleta.

c) Para tanto, você deverá comparecer ao Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade (Departamento de Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Centro Politécnico, Av. Coronel Francisco Heráclito dos Santos, nº 210, Jardim das Américas, Curitiba, PR), para realizar a coleta de sangue.

d) É possível que você experimente algum desconforto na coleta da amostra de sangue.

Participante da Pesquisa e/ou Responsável Legal \_\_\_\_\_

Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE \_\_\_\_\_

Orientadores (Enilze M. S. F. Ribeiro) \_\_\_\_\_

(Angelica B. Winter Boldt) \_\_\_\_\_

e) Riscos relacionados à coleta de sangue são: dor no local devido à punção com agulha, sangramento mínimo, hematoma (marca arroxeadada transitória na pele) e infecção. Outro risco relacionado a esta etapa do estudo é a ansiedade com relação ao possível resultado. Você pode optar em fazer o teste de forma



anônima, decidindo não obter o conhecimento se tem ou não uma alteração em um gene associado ao câncer.

f) Os benefícios diretos esperados com essa pesquisa são o fornecimento de uma estimativa mais precisa do risco de desenvolver certos tipos de cânceres ao longo da vida, tanto seu, quanto de seus parentes (incluindo seus filhos) e a determinação de possíveis alterações em genes associados ao desenvolvimento de câncer, que possam ser transmitidas aos seus filhos ou estar presentes em seus parentes. Se este for o caso e você assim o desejar, receberá aconselhamento quanto às opções de prevenção, uma vez que informações mais precisas sobre o risco de desenvolver um câncer poderão ajudar-lhe a tomar decisões quanto aos métodos de detecção precoce ou cirurgias preventivas, que diminuirão consideravelmente o seu risco. Caso o resultado seja negativo, você evitará testes de detecção precoce ou cirurgias preventivas desnecessárias, além da certeza de que não transmitiu essa mutação para seus filhos já nascidos, nem a transmitirá para futura e eventual prole. Benefícios indiretos incluem a caracterização da população Menonita do Brasil, inclusive os membros de sua família, quando estes assim o desejarem, quanto ao risco de desenvolver um câncer hereditário. Tais informações poderão auxiliar a identificar indivíduos em risco, acompanhar e a tratar diferencialmente sua pessoa e seus familiares, assim como outros pacientes. Portanto, embora nem sempre você seja diretamente beneficiado com o resultado da pesquisa, a sua participação também poderá contribuir para o avanço científico na área.

g) As pesquisadoras Prof<sup>as</sup> Enilze M. S. F. Ribeiro e Angelica B. W. Boldt, responsáveis por este estudo, poderão ser localizadas no Departamento de Genética do Setor de Ciências Biológicas (Universidade Federal do Paraná, Centro Politécnico, Jardim das Américas, Curitiba, PR), no e-mail enilzeribeiro@gmail.com e angelicaboldt@gmail.com e telefones (041) 3361-1555 e (041) 3361-1553, respectivamente, no horário comercial (8-18:00), para esclarecer eventuais dúvidas que você possa ter e fornecer-lhe as informações que queira, antes, durante ou depois de encerrado o estudo.

Participante da Pesquisa e/ou Responsável Legal \_\_\_\_\_

Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE \_\_\_\_\_

Orientadores (Enilze M. S. F. Ribeiro) \_\_\_\_\_

(Angelica B. Winter Boldt) \_\_\_\_\_

j) A sua participação neste estudo é voluntária e não irá influenciar no seu acesso ao tratamento médico agora ou no futuro. Se você não quiser mais fazer parte da pesquisa, poderá desistir a qualquer momento, sem que isto influencie no tratamento médico, e solicitar que lhe devolvam este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido assinado. Você terá a opção de participar deste estudo e não

saber do resultado da análise, ou seja, seu DNA será estudado para alterações em genes de predisposição ao câncer, mas o resultado ficará restrito ao conhecimento da equipe que se encarregará de lhe recomendar condutas de prevenção de câncer, de acordo com o seu risco. Após o teste, você poderá decidir transmitir o resultado do mesmo a outros familiares. Isso não significa que você estará dando consentimento para que outros membros da sua família realizem o teste genético. Nenhum familiar será contatado por membro do Grupo de Pesquisa sem a sua autorização. Caso outros familiares decidam participar, serão atendidos e esclarecidos pela equipe e assinarão o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para então serem submetidos à análise molecular. Quando a análise estiver concluída, você será contatado e convidado a marcar uma consulta para receber o resultado do exame, pessoalmente. Nenhuma informação será fornecida por telefone, carta ou internet, independentemente do resultado. Você também poderá ser contatado, no decorrer do estudo, por membros desta equipe, para obter informações sobre a sua saúde ou sobre a saúde dos outros familiares.

As informações relacionadas ao estudo poderão ser conhecidas por pessoas autorizadas da equipe de pesquisa do Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética, chefiado pela Prof<sup>a</sup> Enilze M. S. F. Ribeiro, com a garantia de que **seu nome jamais será revelado**, ainda que os dados sejam, eventualmente, utilizados para propósitos educativos ou de publicações científicas, que ocorrerão independentemente dos resultados obtidos. Portanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito sob forma codificada, para que a sua identidade seja preservada e mantida sua confidencialidade. A informação médica resultante deste teste tornar-se-á parte de seu prontuário médico se você assim o desejar e o entregar ao seu médico pessoal, sendo que o resultado final do teste genético será mantido, unicamente, em arquivos da equipe de pesquisa. Ratifica-se que, no prontuário, constará apenas a sua participação no estudo de pesquisa e a realização do teste, mas não o resultado, que somente poderá ser fornecido a pessoas, instituições, empresas, companhias de seguro de saúde e demais instituições, mediante sua prévia e expressa autorização por escrito.

Participante da Pesquisa e/ou Responsável Legal \_\_\_\_\_

Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE \_\_\_\_\_

Orientadores (Enilze M. S. F. Ribeiro) \_\_\_\_\_

(Angelica B. Winter Boldt) \_\_\_\_\_

Os dados utilizados em pesquisa e/ou publicações científicas não terão identificação dos participantes. Por meio das análises de DNA é possível identificar a não paternidade ou maternidade (ou seja, que seus pais, ou um

deles, podem não ser realmente seus pais biológicos). Assim, caso a análise genética identificar que você não é filho biológico de um ou de ambos os genitores, esta informação não será revelada nem a sua pessoa nem a qualquer outra que não seja da equipe de estudo.

As amostras de sangue serão utilizadas unicamente para essa pesquisa. As amostras obtidas a partir deste material, com finalidade de realizar este estudo, ficarão armazenadas no biorrepositório do Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética do Departamento Genética da Universidade Federal do Paraná (UFPR), com sede em Curitiba, na Av. Coronel Francisco Heráclito dos Santos, nº 210, Bairro Jardim das Américas, no Campus II do Centro Politécnico, pelo prazo de 05 anos. Se necessário, serão solicitados mais 05 anos para o Comitê de Ética, sendo descartadas após este período. Contudo, a qualquer momento você poderá solicitar que seu material biológico não seja mais utilizado e que seja descartado, sem que isso acarrete qualquer prejuízo ou constrangimento a você. Caso haja necessidade de utilizá-lo no futuro, você será contatado para consentir ou não sobre o novo uso de sua amostra. Nesse caso, seu consentimento será formalizado através de um novo TCLE específico. Quando isso não for possível, o fato será justificado perante o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP). Toda nova pesquisa a ser feita com o seu material será submetida à apreciação do CEP e sempre que couber também da CONEP, em conformidade com as normas do Conselho Nacional de Saúde (Resolução CNS nº 441/2011).

Participante da Pesquisa e/ou Responsável Legal \_\_\_\_\_

Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE \_\_\_\_\_

Orientadores (Enilze M. S. F. Ribeiro) \_\_\_\_\_

(Angelica B. Winter Boldt) \_\_\_\_\_

As despesas necessárias para a realização da pesquisa, como transporte ao local da coleta, serão de sua responsabilidade. Você não receberá qualquer valor em dinheiro pela sua participação.

Reiterando, quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome, e sim um código.

Agradecemos sua atenção e consideramos louvável que você esteja disponibilizando o seu tempo para conhecer nossos esforços em ajudar os pacientes acometidos pelo câncer. Se você tiver dúvidas sobre seus direitos como participante de pesquisa, você pode contatar também o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP/SD) do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, pelo telefone 3360-7259.

Eu, \_\_\_\_\_ recebi e li esse Termo de Consentimento, e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual concordei em participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento sem justificar minha decisão, sem qualquer prejuízo para mim e sem que esta decisão afete meu atendimento pela equipe de aconselhamento genético.

Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo.

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Participante de Pesquisa ou Responsável Legal

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE

Orientadores (Enilze M. S. F. Ribeiro) \_\_\_\_\_  
(Angelica B. Winter Boldt) \_\_\_\_\_

Endereço para contato:

Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética

Departamento de Genética

Setor de Ciências Biológicas

Campus II - Centro Politécnico

Universidade Federal do Paraná

Caixa Postal 19071, CEP 81531-980.

Av. Coronel Francisco Heráclito dos Santos, nº 210

Jardim das Américas

Curitiba, PR

### C3. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO 3

Nós, Prof<sup>as</sup> Enilze M. S. F. Ribeiro (CRM/PR nº 7861) e Angelica B. Winter Boldt (Matr UFPR 203531), da Universidade Federal do Paraná, estamos

convidando você, pertencente a uma família menonita com histórico de câncer familiar e identificado como tendo risco de câncer hereditário, a participar da terceira etapa de um estudo intitulado LEVANTAMENTO DE CASOS E ANÁLISE GENÉTICA DA POPULAÇÃO MENONITA COM HISTÓRICO DE CÂNCER FAMILIAR. A comunidade menonita no Brasil tem sofrido psicologicamente e economicamente com perdas de entes queridos, acometidos por câncer. Dentre estes, muitos ainda jovens, pertencem a famílias que relatam repetições geracionais deste evento. Até o momento, se desconhecem as possíveis causas genéticas do câncer nesta comunidade.

a) O objetivo desta etapa do estudo é finalizar o aconselhamento genético baseado nos resultados do teste genético, realizado na segunda etapa do estudo.

b) Caso você participe da pesquisa, será necessário discutir os resultados do aconselhamento genético. O aconselhamento genético tem o objetivo de ajudá-lo a lidar com as informações recebidas, fornecidas pelo médico da equipe. Os resultados não serão fornecidos por telefone, e-mail ou carta. Excepcionalmente, o resultado poderá ser fornecido a um de seus familiares, desde que autorizado previamente por você. Durante o Aconselhamento Genético ser-lhe-á explicado que há três possíveis resultados para o teste genético:

1º Você pode ter herdado uma alteração em um gene de predisposição ao câncer (ou seja, um gene que sofreu mutação).

Obs. 1: Mulheres portadoras de mutação em determinados genes podem ter um risco maior de desenvolver câncer de mama e ovário e outros tumores associados à mutação.

Obs. 2: Homens portadores de mutação também possuem risco maior para certos tipos de cânceres.

Obs. 3: Você poderá descobrir, ainda, se tem predisposição para desenvolver um segundo câncer do mesmo tipo ou de um tipo diferente do que já teve.

2º Você pode não ter herdado uma alteração em um gene de predisposição ao câncer.

Participante da Pesquisa e/ou Responsável Legal \_\_\_\_\_

Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE \_\_\_\_\_

Orientadores (Enilze M. S. F. Ribeiro) \_\_\_\_\_

(Angelica B. Winter Boldt) \_\_\_\_\_

Obs.: Neste caso, pode-se concluir que uma alteração nos genes, até agora associados ao câncer, não explica sua história pessoal e familiar para o desenvolvimento de um câncer. Todavia, ainda assim é possível que você tenha herdado outro gene de predisposição ao câncer, para o qual ainda não há testes disponíveis ou que a sensibilidade do teste genético não foi de 100%.

3º Pode ser impossível determinar se você herdou ou não um gene de predisposição alterado (teste inconclusivo).

Obs. 1: Sendo o teste laboratorial inconclusivo, é possível que você tenha uma mutação que, até o momento da entrega do resultado, não tenha sido caracterizada como patogênica, ou seja, ainda não foi associada à predisposição hereditária ao câncer.

Obs. 2: Se você assinou o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido 2 (TCLE 2), permitindo que a sua amostra de sangue fosse estudada pelo grupo de pesquisa, o laboratório continuará procurando alterações que possam contribuir para ocorrência de câncer não havendo, todavia, prazo ou promessa de um resultado conclusivo para esta segunda investigação. Qualquer resultado a respeito será confirmado e os membros do grupo de pesquisa entrarão em contato com você.

É possível que você experimente sofrimento psicológico, ao desejar ser informado e receber os resultados. Contudo, você também tem a opção de não querer receber ou querer retardar o recebimento dos resultados da análise genética, sem prejuízo a você ou familiares. Neste caso, você será aconselhado apenas com base nos resultados, sem receber informações da alteração específica.

Para esta etapa, você receberá uma visita de membros da equipe em seu domicílio, ou, caso prefira, deverá comparecer no Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética (Departamento de Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Centro Politécnico, Av. Coronel Francisco Heráclito dos Santos, nº 210, Jardim das Américas, Curitiba, PR), para ser atendido por aproximadamente 40 minutos. A princípio, a divulgação dos resultados será feita em caráter pessoal, podendo, todavia, se fazer acompanhar de um familiar ou pessoa de sua inteira confiança.

Participante da Pesquisa e/ou Responsável Legal \_\_\_\_\_

Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE \_\_\_\_\_

Orientadores (Enilze M. S. F. Ribeiro) \_\_\_\_\_

(Angelica B. Winter Boldt) \_\_\_\_\_

Os riscos relacionados a esta etapa do estudo são, primariamente, de origem psicológica. Tomar conhecimento de que se é portador de um gene de predisposição ao câncer alterado poderá causar sentimentos de depressão, ansiedade, raiva e de medo do futuro. Este resultado poderá afetar as suas relações com familiares e pessoas próximas. Algumas pessoas podem desenvolver um sentimento de culpa muito forte ou ansiedade ao descobrirem que não herdaram um gene de predisposição alterado, enquanto que outros

membros da família o herdaram. A descoberta de um gene de predisposição alterado poderá levar a algum tipo de discriminação por parte de companhias de seguro médico, empregadores e até mesmo familiares. Poderá acontecer, ainda, que o resultado seja inconclusivo, o que ocorre quando o laboratório não consegue determinar a presença ou não de uma alteração em um gene de predisposição ao câncer. Em outras palavras, isso significa que você passou por todo processo da análise, sem obter nenhuma informação nova sobre seu risco pessoal de desenvolver câncer ou de transmitir essa suscetibilidade.

Os benefícios diretos esperados com esse estudo são o aconselhamento genético baseado em uma estimativa mais precisa do risco de desenvolver certos tipos de cânceres ao longo da vida, tanto seu, quanto de seus parentes, para os quais também será ofertado o aconselhamento, caso estes assim o desejarem. Quando o resultado for negativo, você evitará excesso de testes de detecção precoce ou cirurgias preventivas desnecessárias, além da certeza de que não transmitiu essa mutação para seus filhos já nascidos, nem a transmitirá para futura e eventual prole. Benefícios diretos também incluem a identificação de indivíduos sob risco, o acompanhamento e tratamento diferencial de sua pessoa e seus familiares, assim como outros pacientes, desde que este resultado poderá ser informado ao seu médico pessoal que tomará as devidas medidas preventivas. Embora nem sempre você seja diretamente beneficiado com o resultado da pesquisa, a sua participação também poderá contribuir para o avanço científico na área.

g) As pesquisadoras profa Enilze M. S. F. Ribeiro e profa Angelica B. W. Boldt, responsáveis por este estudo, poderão ser localizadas no Departamento de Genética do Setor de Ciências Biológicas (Universidade Federal do Paraná, Centro Politécnico, Jardim das Américas, Curitiba, PR), no e-mail enilzeribeiro@gmail.com e angelicaboldt@gmail.com e telefones (041) 3361-1555 e (041) 3361-1553, respectivamente, no horário comercial (8-18:00), para esclarecer eventuais dúvidas que você possa ter e fornecer-lhe as informações que queira, antes, durante ou depois de encerrado o estudo.

Participante da Pesquisa e/ou Responsável Legal \_\_\_\_\_  
Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE \_\_\_\_\_  
Orientadores (Enilze M. S. F. Ribeiro) \_\_\_\_\_  
(Angelica B. Winter Boldt) \_\_\_\_\_

A sua participação neste estudo é voluntária e não irá influenciar no seu acesso ao tratamento médico agora ou no futuro. Se você não quiser mais fazer parte da pesquisa, poderá desistir a qualquer momento, sem que isto influencie no tratamento médico, e solicitar que lhe devolvam este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido assinado. Após o aconselhamento, você

poderá transmitir o resultado do mesmo a outros familiares. Isso não significa que você estará dando consentimento para que outros membros da sua família realizem o teste genético. Nenhum familiar será contatado por membro do Grupo de Pesquisa, sem a sua autorização. Caso outros familiares decidam participar, serão atendidos e esclarecidos pela equipe e assinarão o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido 2 (TCLE 2) para então serem submetidos à análise molecular. Você também poderá ser contatado, no decorrer do estudo, por membros desta equipe, para obter informações sobre a sua saúde ou sobre a saúde dos outros familiares.

As informações relacionadas ao aconselhamento poderão ser conhecidas por pessoas autorizadas da equipe de pesquisa do Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética, chefiado pela Prof<sup>a</sup> Enilze M. S. F. Ribeiro, com a garantia de que **seu nome jamais será revelado**, ainda que os dados sejam, eventualmente, utilizados para propósitos educativos ou de publicações científicas, que ocorrerão independentemente dos resultados obtidos. Portanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito sob forma codificada, para que a sua identidade seja preservada e mantida sua confidencialidade.

As informações obtidas por meio do aconselhamento genético serão utilizadas unicamente para essa pesquisa e ficarão armazenadas no biorrepositório do Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética do Departamento Genética da Universidade Federal do Paraná (UFPR), com sede em Curitiba, na Av. Coronel Francisco Heráclito dos Santos, nº 210, Bairro Jardim das Américas, no Campus II do Centro Politécnico, pelo prazo de 05 anos. Se necessário, serão solicitados mais 05 anos para o Comitê de Ética, sendo descartadas após este período. Contudo, a qualquer momento você poderá solicitar que suas informações não sejam mais utilizadas e que sejam descartadas, sem que isso acarrete qualquer prejuízo ou constrangimento a você. Caso haja necessidade de utilizá-las após conclusão do projeto, você será contatado para consentir ou não sobre o novo uso de suas informações. Nesse caso, seu consentimento será formalizado através de um novo TCLE específico. Quando isso não for possível, o fato será justificado perante o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP). Toda nova pesquisa a ser feita com as suas informações será submetida à apreciação do CEP e sempre que couber também da CONEP, em conformidade com as normas do Conselho Nacional de Saúde (Resolução CNS nº 441/2011).

Participante da Pesquisa e/ou Responsável Legal \_\_\_\_\_

Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE \_\_\_\_\_

Orientadores (Enilze M. S. F. Ribeiro) \_\_\_\_\_

(Angelica B. Winter Boldt) \_\_\_\_\_



As despesas necessárias para a realização da pesquisa, como transporte ao local do aconselhamento, serão de sua responsabilidade, a não ser que prefira receber a equipe em seu domicílio, em horário que lhe for mais conveniente. Você não receberá qualquer valor em dinheiro pela sua participação.

Reiterando, quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome, e sim um código.

Agradecemos sua atenção e consideramos louvável que você esteja disponibilizando do seu tempo para conhecer nossos esforços em ajudar os pacientes acometidos pelo câncer. Se você tiver dúvidas sobre seus direitos como participante de pesquisa, você pode contatar também o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP/SD) do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, pelo telefone 3360-7259.

Eu, \_\_\_\_\_ recebi e li esse Termo de Consentimento, e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual concordei em participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento sem justificar minha decisão, sem qualquer prejuízo para mim e sem que esta decisão afete meu atendimento pela equipe de aconselhamento genético.

Participante da Pesquisa e/ou Responsável Legal \_\_\_\_\_

Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE \_\_\_\_\_

Orientadores (Enilze M. S. F. Ribeiro) \_\_\_\_\_

(Angelica B. Winter Boldt) \_\_\_\_\_

Declaro, ainda, que, de livre e espontânea vontade, estando plenamente ciente das consequências que possam advir deste ato, passo a responder aos seguintes questionamentos:

1. Deseja tomar conhecimento dos resultados do teste genético, os quais poderão informar sobre a existência de um gene alterado (que sofreu mutação), o qual aumenta o risco de desenvolvimento de um câncer hereditário e/ou outros tipos de câncer? Marque com um X.

( ) Sim      ( ) Não

2. Deseja ser contatado(a) por membros da pesquisa, no caso de novas informações sobre o risco câncer de mama/ovário e outros tipos de câncer, ou de novas pesquisas nesta área das quais gostaria de participar?

( ) Sim      ( ) Não

3. Em caso de impossibilidade de receber o resultado do teste genético, autorizo a seguinte pessoa: \_\_\_\_\_ a recebê-lo (pessoalmente) por mim, mediante apresentação do RG.

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Participante de Pesquisa ou Responsável Legal

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE

Orientadores (Enilze M. S. F. Ribeiro) \_\_\_\_\_  
(Angelica B. Winter Boldt) \_\_\_\_\_

Endereço para contato:

Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética

Departamento de Genética

Setor de Ciências Biológicas

Campus II - Centro Politécnico

Universidade Federal do Paraná

Caixa Postal 19071, CEP 81531-980.

Av. Coronel Francisco Heráclito dos Santos, nº 210

Jardim das Américas

Curitiba, PR