

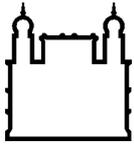
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Biologia Celular e Molecular

**CARACTERIZAÇÃO DO GENE *RB1* E DA REGIÃO CROMOSSÔMICA 13q14 EM
PORTADORES DE DELEÇÕES EM *RB1*, E ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DE
POLIMORFISMOS DO GENE *CDKN1B* EM PORTADORES DE
RETINOBLASTOMA**

RENATA MENDES DE FREITAS

Rio de Janeiro
Outubro de 2018



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia celular e molecular

RENATA MENDES DE FREITAS

CARACTERIZAÇÃO DO GENE *RB1* E DA REGIÃO CROMOSSÔMICA 13q14 EM PORTADORES DE DELEÇÕES EM *RB1*, E ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS DO GENE *CDKN1B* EM PORTADORES DE RETINOBLASTOMA

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do título
de Doutor em Ciências

Orientador: Dr. Fernando Regla Vargas

RIO DE JANEIRO

Outubro de 2018

Mendes de Freitas, Renata.

CARACTERIZAÇÃO DO GENE *RB1* E DA REGIÃO CROMOSSÔMICA 13q14 EM PORTADORES DE DELEÇÕES EM *RB1*, E ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS DO GENE *CDKN1B* EM PORTADORES DE RETINOBLASTOMA / Renata Mendes de Freitas. - Rio de Janeiro, 2018. 176 f.; il.

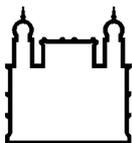
Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2018.

Orientador: Fernando Regla Vargas.

Bibliografia: f. 139-156

1. Retinoblastoma. 2. Deleções no gene *RB1*. 3. Deleções na região 13q14. 4. rs2066827. 5. gene *CDKN1B*. I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manginhos/CICT com os dados fornecidos pelo(s) autor(s).



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia celular e molecular

AUTOR: RENATA MENDES DE FREITAS

**CARACTERIZAÇÃO DO GENE *RB1* E DA REGIÃO CROMOSSÔMICA 13q14
EM PORTADORES DE DELEÇÕES EM *RB1*, E ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO
DE POLIMORFISMOS DO GENE *CDKN1B* EM PORTADORES DE
RETINOBLASTOMA**

ORIENTADOR: Dr. Fernando Regla Vargas

Aprovada em: 29/10/2018

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Luciana Lopes de Almeida Ribeiro Garzoni - **Presidente** (IOC/FIOCRUZ)

Prof. Dra. Cibele Rodrigues Bonvicino (INCA/RJ)

Prof. Dra. Sima Esther Ferman (INCA/RJ)

Prof. Dr. Pedro Hernan Cabello Acero (IOC/FIOCRUZ)

Prof. Dra. Cynthia Chester Cardoso (UFRJ/RJ)

Rio de Janeiro, 29 de outubro de 2018

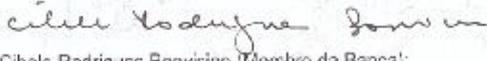


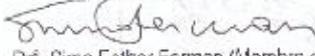
Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz

Ata da defesa de tese de doutorado em Biologia Celular e Molecular de **Renata Mendes de Freitas**, sob orientação do Dr. Fernando Regla Vargas. Ao vigésimo nono dia do mês de outubro de dois mil e dezoito, realizou-se às nove horas, no Sala 9 - Módulo de Expansão do Pavilhão Arthur Neiva /FIOCRUZ, o exame da tese de doutorado intitulada: "**CARACTERIZAÇÃO DO GENE *RB1* E DA REGIÃO CROMOSSÔMICA 13q14 EM PORTADORES DE DELEÇÕES EM *RB1*, E ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS DO GENE *CDKN1B* EM PORTADORES DE RETINOBLASTOMA**". No programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências - área de concentração: Biologia Celular e Molecular, na linha de pesquisa: Genética molecular e epidemiologia. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr^a. Luciana Lopes de Almeida Ribeiro Garzoni - IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr^a. Cibele Rodrigues Bonvicino - INCA/RJ, Dr^a. Sima Esther Ferman - INCA/RJ e como suplentes: Dr. Pedro Herman Cabollo Acero – IOC/FIOCRUZ e Dr^a. Cynthia Chester Cardoso – UFRJ/RJ. Após arguir o candidato e considerando que a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela **APROVAÇÃO** da defesa da tese de doutorado. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Doutora em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, a Coordenadora do Programa Dr^a. Leila de Mendonça Lima, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 29 de outubro de 2018.


Dr^a. Luciana Lopes de Almeida Ribeiro Garzoni (Presidente da Banca):


Dr^a. Cibele Rodrigues Bonvicino (Membro da Banca):


Dr^a. Sima Esther Ferman (Membro da Banca):


Dr^a. Leila de Mendonça Lima (Coordenadora do Programa):

**Dedico este trabalho a todos os
pacientes de retinoblastoma e
seus familiares.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus sempre em primeiro lugar. Ele me permitiu percorrer toda esta trajetória;

Aos meus amados pais, Wilson e Maria José, que sempre investiram na minha educação e me deram todo amor;

Ao meu querido William Domingues por sempre acreditar na minha intelectualidade e me fazer pensar que tudo é possível quando acreditamos; obrigada por todo amor e carinho nesses anos de abdicção e dedicação;

Aos meus amigos e familiares que torcem por meu sucesso e que estiveram comigo mesmo nos momentos de ausência;

A todo o grupo do Laboratório de Genética Humana da Fiocruz/ RJ pelo apoio e ensinamentos, em especial a Gaby, Amanda e Carol que tornaram meus dias mais alegres; agradeço também em especial ao Dr. Mário Campos Júnior que foi extremamente importante na concretização e finalização deste trabalho.

Aos pesquisadores do Laboratório Epidemiológico de Malformações Congênitas da Fiocruz/ RJ pela convivência durante esses quatro anos, em especial ao Dr. Fernando Vargas que me oportunizou realizar meu sonho em fazer o doutorado na Instituição Oswaldo Cruz;

Agradeço a Dra. Ivna Carvalho pela cooperação, amizade e ensinamentos que muito contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho;

Aos médicos pediatras que colaboraram na construção da pesquisa, em especial a Dra. Anna Claudia Evangelista, médica pediatra do INCA, que sempre esteve integrada às nossas necessidades e dificuldades;

À Dra. Ana Carolina Guimarães pela parceria e aprendizado que permitiram engrandecer meu trabalho;

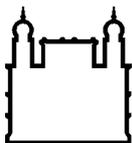
Aos pacientes com retinoblastoma que doaram seu próprio “sangue” para a pesquisa científica e contribuíram muito para a aquisição de novos conhecimentos e um futuro melhor;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelo auxílio financeiro.

Uma vitória precisa ser conquistada...

Objetivo nenhum é alcançado se não por sacrifícios!

(Renata Mendes de Freitas)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

CARACTERIZAÇÃO DO GENE *RB1* E DA REGIÃO CROMOSSÔMICA 13q14 EM PORTADORES DE DELEÇÕES EM *RB1*, E ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS DO GENE *CDKN1B* EM PORTADORES DE RETINOBLASTOMA

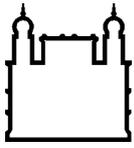
RESUMO

TESE DE DOUTORADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Renata Mendes de Freitas

O retinoblastoma se inicia, na grande maioria dos casos, a partir de dois eventos mutacionais no gene *RB1* nos retinoblastos. O rastreamento desse gene em portadores da doença e em seus familiares torna-se importante para caracterizar mutações germinativas causadoras da tumorigênese e promover o acompanhamento genético das famílias. Porém, a doença pode ser modulada pela presença de diversos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs). No presente estudo foi realizado o rastreamento do gene *RB1* em 11 probandos diagnosticados com retinoblastoma através de sequenciamento Sanger e a caracterização genômica, através de PCR em tempo real e *array*-CGH, de cinco portadores de retinoblastoma com deleção do gene *RB1* previamente identificados por Sena (2013), sendo que dois probandos apresentam deleção parcial e três com deleção completa do gene *RB1*. Foram identificadas duas variantes em regiões exônicas e 18 em regiões intrônicas, sendo seis ainda não descritas (c.848 G>T; c.380+145 T>A; c.1216-28 C>T; c.1389+134 A>T; c.1389+143 C>T; c.1814+72 T>A). Três mutações germinativas identificadas no gene *RB1* foram analisadas por modelagem comparativa, para verificar os domínios alterados pelas mutações e correlacioná-las com o comprometimento da funcionalidade da proteína retinoblastoma. As mutações do tipo *stop* códon, que afetam o domínio *pocket* da proteína, são associadas com a forma bilateral

da doença. Uma metodologia em PCR em tempo real foi desenvolvida para dosar o número de cópias gênicas do *RB1*, *SUCLA2* e *MED4*, localizados na região 13q14, em 5 probandos diagnosticados com retinoblastoma investigados para deleções. Foi detectada a presença de deleções completas e intragênicas no *RB1*, *SUCLA2* e *MED4*, de forma a validar os resultados obtidos previamente pela técnica de MLPA. Entre os probandos com deleção completa, o tamanho da deleção variou de 12 a 42 Mb. Foi realizada uma revisão sistemática da literatura para investigar associação entre tamanho da deleção do gene *RB1* e lateralidade tumoral. Foram incluídos, além do presente estudo, outros 11 estudos, totalizando 112 probandos com deleção parcial ou completa do gene *RB1*. A forma bilateral da doença foi mais prevalente no grupo de probandos portadores de deleções parciais do gene *RB1*, quando comparado com probandos com deleção completa ($p=0,00007$). Em função do pequeno número de estudos disponíveis, não foi possível analisar a correlação entre tamanho da deleção, e a deleção concomitante dos genes adjacentes *MED4* e *SUCLA2*. O polimorfismo rs2066827 no gene *CDKN1B*, importante regulador do ciclo celular, codificador da proteína p27, foi avaliado em 72 portadores do retinoblastoma como um possível modificador do fenótipo. Não se verificou associação desse SNP como agente de susceptibilidade ao desenvolvimento do retinoblastoma, nem efeito protetor. Observou-se maior proporção do genótipo heterozigótico entre os controles avaliados neste estudo, mas sem significância estatística. As frequências alélicas também não apresentaram associação estatística. Contudo, a comparação da distribuição de genótipos dos 72 probandos analisados com outro grupo controle retirado da população brasileira para o mesmo polimorfismo investigado por Longuini et al. (2014) mostrou diferença significativa ($p=0,03$).



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

CHARACTERIZATION OF THE *RB1* GENE AND THE 13q14 CHROMOSOMAL REGION IN CARRIERS OF DELETIONS IN *RB1*, AND THE ASSOCIATION STUDY OF *CDKN1B* GENE POLYMORPHISMS IN RETINOBLASTOMA BEARERS

ABSTRACT

PHD THESIS IN PHD THESIS IN CELLULAR AND MOLECULAR BIOLOGY

Renata Mendes de Freitas

Retinoblastoma begins, in the vast majority of cases, from two mutational events in the *RB1* gene in retinoblasts. The screening of this gene in patients with the disease and its relatives becomes important to characterize germ mutations that cause tumorigenesis and to promote the genetic follow-up of the families. However, the disease can be modulated by the presence of several single nucleotide polymorphisms (SNPs). In the present study, the *RB1* gene was screened in 11 probands diagnosed with retinoblastoma through Sanger sequencing and the genomic characterization, through real-time PCR and array-CGH, of five *RB1* deletion retinoblastoma carriers previously identified by Sena (2013), with two probands presenting partial deletion and three with complete deletion of the *RB1* gene. Two variants were identified in exonic regions and 18 in intronic regions, of which six were not yet described (c.848 g> T; c.380 + 145 T> A; c.1216-28 C> T; c.1389 + 134 A > T; c.1389 + 143 C> T; c.1814 + 72 T> A). Three germline mutations identified in the *RB1* gene were analyzed by comparative modeling to verify the domains altered by the mutations and to correlate them with the impairment of the functionality of the retinoblastoma protein. The stop codon mutations, which affect the pocket domain of the protein, are associated with the bilateral form of the disease. A real-time PCR methodology was developed to measure the number of gene

copies of *RB1*, *SUCLA2* and *MED4*, located in the region 13q14, in 5 probands diagnosed with retinoblastoma investigated for deletions. The presence of complete and intragenic deletions was detected in *RB1*, *SUCLA2* and *MED4*, in order to validate the results previously obtained by the MLPA technique. Among the fully deleted probands, the size of the deletion ranged from 12 to 42 Mb. A systematic review of the literature was conducted to investigate the association between size of the *RB1* deletion and tumor laterality. In addition to the present study, 11 other studies were included, totaling 112 probands with partial or complete deletion of the *RB1* gene. The bilateral form of the disease was more prevalent in the group of probands with partial deletions of the *RB1* gene when compared to probands with complete deletion ($p = 0.00007$). Due to the small number of available studies, it was not possible to analyze the correlation between size of the deletion, and the concomitant deletion of adjacent genes *MED4* and *SUCLA2*. The polymorphism rs2066827 in the *CDKN1B* gene, an important cell cycle regulator, encoding the p27 protein, was evaluated in 72 retinoblastoma carriers as a possible phenotype modifier. There was no association of this SNP as an agent of susceptibility to the development of retinoblastoma, nor a protective effect. A higher proportion of the heterozygous genotype was observed among the controls evaluated in this study, but without statistical significance. Allele frequencies were also not statistically associated. However, the comparison of genotype distribution of the 72 probands analyzed with another control group from the Brazilian population for the same polymorphism investigated by Longuini et al. (2014) showed a significant difference ($p = 0.03$).

ÍNDICE

RESUMO	10
ABSTRACT	12
1 INTRODUÇÃO	23
1.1 Retinoblastoma – um câncer ocular infantil.....	23
1.1.2 Retinoblastoma Trilateral	29
1.1.3 Testes genéticos	30
1.2 Genética do retinoblastoma.....	32
1.3 O gene supressor tumoral <i>RB1</i>	37
1.4 A proteína RB e o controle do ciclo celular	40
1.5 Deleções do gene <i>RB1</i> e região cromossômica 13q14	47
1.6 O gene <i>CDKN1B</i> : um inibidor de quinase dependente de ciclina.....	51
1.6.1 Polimorfismos no gene <i>CDKN1B</i>	54
2. HIPÓTESES	57
3. OBJETIVOS	58
3.1 Objetivo Geral	58
3.2 Objetivos Específicos.....	58
4. MATERIAL E MÉTODOS	60
4.1 Caracterização da amostra	60
4.1.1 Estimativa da concentração e integridade do DNA	62
4.2 Rastreamento de mutações germinativas em <i>RB1</i>	63
4.3 Predições <i>in silico</i> de variantes no gene <i>RB1</i>	63
4.4 Modelagem molecular de mutações na proteína retinoblastoma	64
4.5 Revisão sistemática da literatura de casos com a síndrome da deleção 13q14 com retinoblastoma	65
4.6 PCR em Tempo Real	66
4.6.1 Desenho dos oligonucleotídeos	68

4.6.2	Teste de otimização da concentração dos oligonucleotídeos	70
4.6.3	Teste de diluição de DNA	73
4.6.4	Ensaio de dosagem do número de cópias gênicas	76
4.7	Array-CGH	78
4.8	Análise do polimorfismo rs2066827 no gene <i>CDKN1B</i>	79
5.	RESULTADOS	82
5.1	Características clínicas de pacientes com retinoblastoma.....	82
5.2	Rastreamento do gene <i>RB1</i> em pacientes com retinoblastoma	84
5.3	Predições <i>in silico</i> de variantes do gene <i>RB1</i> :.....	95
5.4	Modelagens moleculares de mutações na proteína RB:.....	96
5.5	Revisão sistemática da literatura de casos da síndrome 13q14 com retinoblastoma.....	107
5.6	Dosagem do número de cópias gênicas dos genes <i>SUCLA2</i> , <i>MED4</i> e <i>RB1</i>	113
5.7	Validação das deleções em genes da região cromossômica 13q14 por Array-CHG:	115
5.8	Genotipagem do polimorfismo rs2066827 no gene <i>CDKN1B</i>	116
6	DISCUSSÃO	120
6.1	Características clínicas de pacientes com retinoblastoma.....	120
6.2	Alterações no rastreamento do gene <i>RB1</i>	123
6.3	Modelagens moleculares das mutações na proteína RB	127
6.4	Revisão sistemática da literatura para os casos da síndrome 13q14 com retinoblastoma.....	128
6.5	Dosagens gênicas dos genes <i>SUCLA2</i> , <i>MED4</i> e <i>RB1</i>	129
6.6	Genotipagem do polimorfismo rs2066827 no gene <i>CDKN1B</i>	134
7	CONCLUSÃO	137
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	139
9	APÊNDICES	156
9.1	TCLE (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido).....	156

9.2 Aprovação do comitê de ética para o desenvolvimento da pesquisa	160
9.3 Genotipagem dos pacientes com retinoblastoma para o polimorfismo rs2066827	161
9.4 Genotipagem de grupo controle para o polimorfismo rs2066827	164
9.5 Revisão de literatura dos casos de retinoblastoma com deleção no gene <i>RB1</i> e região 13q14	167
9.6 Artigo publicado	177

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Representação de um fundo de olho humano normal.....	24
Figura 2: A) Imagem de um fundo de olho humano normal. B) Presença de massa tumoral.	26
Figura 3: Cromossomo 13, <i>Homo sapiens</i>	32
Figura 4: A) Retinoblastoma não hereditário. B) Retinoblastoma hereditário.	34
Figura 5: O funcionamento adequado da p53.....	39
Figura 6: Estrutura das proteínas membro da família <i>pocket</i>	41
Figura 7: Ação das proteínas pRB e E7 viral no ciclo celular.	43
Figura 8: A pRB hipofosforilada associa-se a promotores gênicos e ao E2F, inibindo a transcrição através do domínio <i>pocket</i>	44
Figura 9: Representação das classes e dos tipos de quinases dependentes de ciclinas (CDKs)	45
Figura 10: A regulação do ciclo celular mediante a fosforilação da pRB permite a divisão celular e transcrição gênica mediante liberação do fator E2F.	46
Figura 11: Cromossomo 13. Em destaque, as regiões envolvidas na síndrome 13q e seus principais fenótipos.....	48
Figura 12: Representação da proteína inibidora de quinase, dependente de ciclina p27.....	51
Figura 13: A proteína p27 inibe o complexo ciclina-CDK	52
Figura 14: Representação gráfica das interações nucleares e citoplasmáticas de p27.....	53
Figura 15: A diminuição dos produtos proteicos p27 interfere na inativação dos complexos ciclina-CDK.....	54
Figura 16: Fluxograma da metodologia utilizada para o rastreamento de mutações no gene <i>RB1</i>	61
Figura 17: A) Esquema representativo das fases exponencial e platô da reação de qPCR. A fase de platô corresponde a PCR convencional. B) Curvas de amplificação que na fase exponencial ultrapassa a linha de <i>threshold</i>	67
Figura 18: Desenho esquemático da localização genômica dos genes <i>SUCLA2</i> , <i>MED4</i> e <i>RB1</i> , localizados no cromossomo 13, avaliados na técnica de qPCR.	68
Figura 19: Curvas de dissociação (curvas de <i>Melting</i>) dos genes alvo e controle da reação de PCR em tempo real.	71
Figura 20: Gráfico CT <i>versus</i> Concentração dos oligonucleotídeos do gene referência (<i>ALB</i>).	72
Figura 21: Gráficos do teste de diluição de DNA.	74
Figura 22: Etapas da técnica de <i>array</i> -CGH.	78
Figura 23: Esquema do gene <i>CDKN1B</i> , localizado na região cromossômica 12p13, com seus codificadores, tamanhos e localização do polimorfismo avaliado neste estudo.....	79
Figura 24: Esquema representativo das técnicas utilizadas neste estudo.	81
Figura 25: Eletroferograma mostrando a posição genômica g. 48362944	88
Figura 26: Eletroferograma mostrando a posição genômica g. 48955473	88
Figura 27: Eletroferogramas das variantes intrônicos encontradas no rastreamento do gene <i>RB1</i> no grupo prospectivo.....	94

Figura 28: Alinhamento múltiplo contendo a sequência alvo (P06400) e as sequências moldes (4elj e 4ell) utilizadas para a modelagem comparativa.	98
Figura 29: Domínios da proteína retinoblastoma.	99
Figura 30: Resultado das análises de Ramachandran plot (A) e ERRAT (B) do modelo gerado para a mutação c.751C>T – p.R251X.	101
Figura 31: Resultado das análises de Ramachandran plot (A) e ERRAT (B) do modelo gerado para a mutação c.763C>T - p.R255X.	102
Figura 32: Resultado das análises de Ramachandran plot (A) e ERRAT (B) do modelo gerado para a mutação c.1574C>G – p.A525G.	103
Figura 33: Alinhamento estrutural do modelo gerado para a mutação c.751C>T – p.R251X (verde) com a proteína selvagem (rosa - azul).	104
Figura 34: Alinhamento estrutural do modelo gerado para a mutação c.763C>T - p.R255X (azul turquesa) com a proteína não mutada (rosa - azul).	105
Figura 35: Alinhamento estrutural do modelo gerado para a mutação c.1574C>G - p.A525G (cinza) com a proteína não mutada (rosa - azul).	106
Figura 36: Resultados das dosagens gênicas nos genes <i>SUCLA2</i> , <i>MED4</i> e <i>RB1</i> (éxons 3,10, 20 e 24) em pacientes com retinoblastoma.	114
Figura 37: Imagens da técnica de array-CGH dos cinco probandos avaliados.	115

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Complexos RB-E2F prevalentes durante cada fase do ciclo celular	42
Tabela 2: Mutações selecionadas para a realização de modelagem comparativa.	64
Tabela 3: Critérios para desenho dos oligonucleotídeos para PCR em tempo real.....	69
Tabela 14: Mutações germinativas selecionadas para modelagem molecular.	96
Tabela 15: Resultados de avaliação dos modelos e dos moldes utilizando os programas ERRAT e PROCHECK.....	100
Tabela 16: Trabalhos publicados com ênfase na deleção 13q14 em pacientes com retinoblastoma.....	108
Tabela 17: Teste do qui-quadrado (χ^2) aplicado aos casos de deleções completas e parciais de pacientes com retinoblastoma identificados na literatura quanto à lateralidade da doença. ...	109
Tabela 18: Pontos de quebra de deleções envolvendo o gene <i>RB1</i> em pacientes com retinoblastoma encontrados na literatura.....	110
Tabela 19: Distribuição genotípica do rs2066827 no gene <i>CDKN1B</i> em 72 pacientes com retinoblastoma que pertencem a coorte e 134 indivíduos sem o tumor.	116
Tabela 20: Teste do qui-quadrado (χ^2) para os genótipos dos 72 pacientes com retinoblastoma e de 134 indivíduos do grupo controle para o polimorfismo rs2066827 a fim de verificar o equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW).....	116
Tabela 21: Teste do qui-quadrado (χ^2) aplicado aos grupos de pacientes com retinoblastoma (72) e controles (134) deste estudo.	117
Tabela 22: Teste do qui-quadrado (χ^2) para as frequências alélicas dos grupos (pacientes com RB e controles).....	118
Tabela 23: Teste do qui-quadrado (χ^2) para o grupo de pacientes com retinoblastoma (72) e o grupo controle (885) utilizado no estudo de Longuini et al. (2014) para o polimorfismo rs2066827.....	119
Tabela 24: Teste do qui-quadrado (χ^2) para as frequências alélicas dos grupos de pacientes com retinoblastoma e controles de Longuini et al., 2014.....	119

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

RB – Retinoblastoma

NCBI – National Center of Biotechnology Information

mm – Milímetro

PCR – Polymerase Chain Reaction

NGS – *Next-Generation Sequencing*

RBT – Retinoblastoma Trilateral

CpG – Citosina – fósforo – Guanina

kb – Quilo Bases

pRB – Proteína Retinoblastoma

E2F – *Elongation Factor 2*

HPV – Vírus do *Papiloma humano*

CDK – Quinases Dependentes de Ciclinas

CDKI – Inibidoras de Quinases Dependentes de Ciclinas

mt-DNA – DNA mitocondrial

Mb – Mega Base

FISH – *Fluorescence In Situ Hydrization*

MLPA – *Multiplex Ligation-Probe Amplification*

QMFPQR – *Quantitative Multiplex Fluorescence PCR*

ATP – Adenosina Trifosfato

SNP – *Single Nucleotide Polymorphism*

MAF – *Minor Allele Frequency*

INCA – Instituto Nacional do Câncer

HSM – Hospital Santa Marcelina

IFF – Instituto Fernandes Figueira

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

PDB – Protein Data Bank

CT – *Cycle Threshold*

NRC – Número Relativo de Cópias

TM – Temperatura de *Melting*

ALB – Albumina

nM – Nanomolar

ng – Nanograma

pb – Pares de Bases

μM – Micromolar

mM – Minimolar

ExAC – Exome Aggregation Consortium

LOVD – Leiden Open Variation Database

dbSNP – Short Genetic Variations

HWE – Equilíbrio de Hardy-Weinberg

Tyr – Tirosina

Leu – Leucina

Phe – Fenilalanina

Glu – Glicina

Asp – Asparagina

cm – centímetro

cDNA – DNA complementar

1 INTRODUÇÃO

1.1 Retinoblastoma – um câncer ocular infantil

O câncer constitui, entre as crianças e adolescentes, a primeira causa de óbito, por doença. O câncer infanto-juvenil envolve de 1% a 4% de todos os tumores malignos, na maioria da população, sendo a leucemia o tipo tumoral mais recorrente seguido dos linfomas e tumores do sistema nervoso central (Galindo et al., 2015).

Tumores embrionários, como o retinoblastoma, neuroblastoma e tumor de Wilms, são responsáveis por cerca de 20% de todas as ocorrências de tumores infanto-juvenis (Instituto Nacional do Câncer – INCA, 2018), sendo estimado em torno de 400 novos casos de retinoblastoma por ano no Brasil (Sociedade Brasileira de Pediatria, 2018; Tucca, 2018).

O retinoblastoma (RB) é um tumor ocular que afeta células da retina, podendo ser hereditário ou esporádico, diagnosticado, geralmente, em crianças até os 5 anos de idade. A prevalência é de 1 em cada 15.000-20.000 nascidos, sendo considerado um tipo neoplásico raro, apesar de ser o câncer de olho mais frequente na infância (Aerts et al., 2006; Khalid et al., 2015; Scollon et al., 2017).

Nos Estados Unidos e na Europa, a incidência do retinoblastoma, em crianças de 0 - 4 anos de idade, é de 10 a 12 casos por milhão. No Brasil, a incidência é variável, de acordo com cada região. Curitiba-PR é a capital brasileira que apresenta a mais baixa taxa de incidência (3,5 por milhão), enquanto Natal-RN apresenta a maior taxa de incidência (12,7 por milhão), conforme descrito por De Camargo et al., 2010.

Há hipóteses de que o retinoblastoma possa ser mais frequente nos países da América Latina, na África e Índia (Chantada et al., 1999; De

Camargo et al., 2010). Alguns estudiosos tentam associar a maior incidência em países em desenvolvimento, ao grau de instrução dos pais, ao perfil socioeconômico das famílias, à qualificação profissional da equipe de assistência à saúde e às condições nutricionais materna, ressaltando, por exemplo, a quantidade de ácido fólico consumido durante a gravidez (Orjuela et al., 2012; Galindo et al., 2015). A relação entre raça, sexo e lateralidade ocular, nos casos de retinoblastoma, não é encontrada nos estudos conduzidos (Selistre et al., 2016).

Xu et al. (2009) sugerem que o retinoblastoma se desenvolve a partir de alterações genéticas que ocorrem em células precursoras do cone da retina, presentes em maior abundância na região da mácula ocular (Figura 1) (Kapatai et al., 2013).

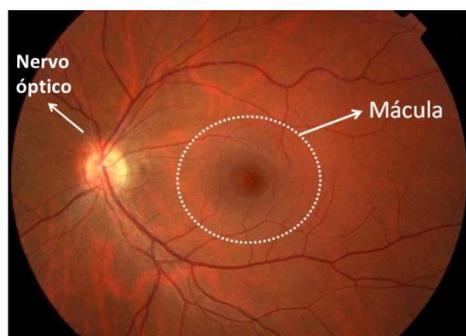


Figura 1: Representação de um fundo de olho humano normal. Em evidência, as regiões da mácula e do nervo óptico.

Fonte: <http://www.isaacramos.com.br/2013/10/19/degeneracao-macular/>, 30/08/2018.

A doença pode afetar apenas um dos olhos, caracterizando-se como unilateral e não hereditária; ou pode afetar ambos os olhos ou apenas um dos olhos, mas com vários pontos multifocais, considerada bilateral e hereditária, (Aerts et al., 2006).

Os principais sinais clínicos da doença são a leucocoria (60% dos casos), o estrabismo (20%) e outros sinais como hiperemia, febre intermitente,

secreção, dor, lacrimejamento, pupila dilatada e perda da visão (Pandey et al., 2014).

Contudo, a apresentação clínica da doença depende do padrão de crescimento tumoral, do grau de vascularização, da presença de calcificações, de sementes vítreas, do deslocamento da retina ou de ocorrência de hemorragia (Balmer et al., 2006).

No entanto, lesões como hemorragia vítrea, deslocamento da retina, catarata congênita, coloboma, toxocaríase e doença de Coats podem ser confundidas com o retinoblastoma e são conhecidas como pseudoretinoblastoma, demandando o exame diferencial, para o correto diagnóstico (Rao e Hovonar, 2017).

A leucocoria apresenta-se como uma mancha esbranquiçada no fundo do olho, identificada com a incidência de uma luz branca durante o teste do reflexo vermelho (ou teste do olhinho) em recém-nascidos. Esse exame baseia-se na percepção do reflexo vermelho, ao ser incidido um feixe de luz sob a superfície retiniana. Quando a retina é atingida, normalmente, o reflexo apresenta tons avermelhados. Isso significa que as principais estruturas internas do olho estão transparentes. Assim, na presença de massa tumoral ou de outra alteração, é possível observar o reflexo em tonalidades esbranquiçadas (Sociedade Brasileira de Pediatria, 2018). Entretanto, é importante salientar que esse teste pode não diagnosticar pequenas lesões e aquelas localizadas na periferia retiniana, não substituindo a oftalmoscopia em recém-nascidos, objetivando ao diagnóstico precoce do retinoblastoma (Ali et al., 2018).

Na Figura 2, apresenta-se o fundo do olho humano sem a doença, com a presença de massa tumoral e a leucocoria no olho de uma criança.

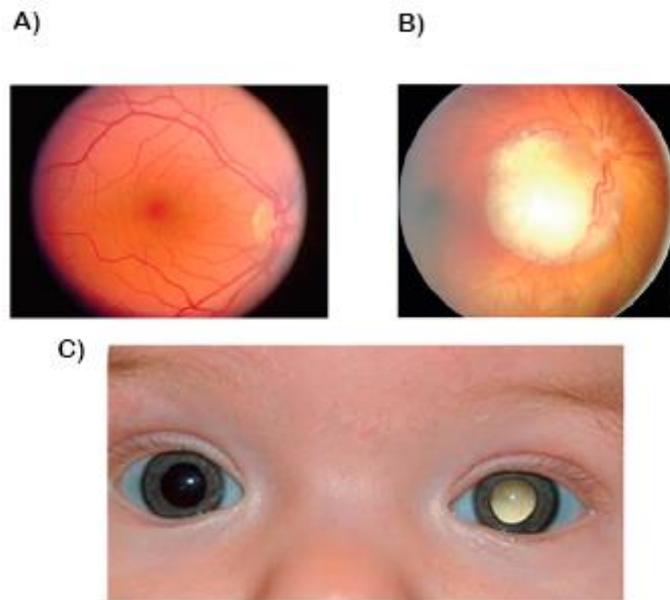


Figura 2: A) Imagem de um fundo de olho humano normal. B) Presença de massa tumoral. C) Leucocoria percebida mediante a incidência de luz.

Fonte: Ortiz e Dunkel, 2015.

Raramente, o retinoblastoma ocorre em adultos. Segundo Zafar et al. (2013), até o ano de publicação de seu estudo, apenas 26 casos foram publicados na literatura; após 5 anos, esse número não apresentou aumento considerável (NCBI, 2018).

Esse tipo da doença em adultos difere da pediátrica, sendo caracterizada por inflamação ocular, hemorragia vítrea e catarata, que são os sinais clínicos mais comumente associados ao retinoblastoma em adultos (Zafar et al., 2013). Algumas hipóteses tentam esclarecer a apresentação tardia do retinoblastoma; a rara persistência de células retinianas embrionárias, que podem gerar uma transformação maligna tardia, ou sugerir que o tumor possa ter regredido de forma espontânea, sem ter sido diagnosticado, sendo, posteriormente, reativado (Sharifzadeh et al., 2014).

Por ocasião deste estudo, três sistemas de classificação são utilizados para avaliar o estadiamento do retinoblastoma. O estadiamento fundamenta-se em imagens de tomografia computadorizada ou imagem de ressonância magnética, que descreve aspectos do tumor como a localização, a disseminação e o comprometimento de outros órgãos, dentre outras

particularidades. Conhecer esses aspectos ajuda a definir o tipo de tratamento e a estimar o prognóstico do paciente (Aerts et al., 2006).

A classificação Reese-Ellsworth, elaborada em 1960, quando a maioria do tratamento era feito com radioterapia externa, classifica o retinoblastoma intraocular com o objetivo de preservar o olho e a visão. Esse sistema classifica a doença em cinco grupos de estadiamento, conforme o tamanho, a extensão e o foco tumoral (Aerts et al., 2006; Instituto Oncoguia, 2018):

- Grupo I: muito favorável para a preservação do olho;
- Grupo II: Favorável para a preservação do olho;
- Grupo III: Duvidoso para a preservação do olho;
- Grupo IV: Desfavorável para a preservação do olho;
- Grupo V: Muito desfavorável para a preservação do olho.

A classificação internacional é o sistema mais recente para tumores intraoculares e dividido em cinco estádios que considera a preservação dos olhos com base nas atuais formas de tratamento (Aerts et al., 2006; Ortiz e Dunkel, 2015; Instituto Oncoguia, 2018):

- Grupo A: Tumores com até 3 mm de diâmetro confinados à retina, próximos à região do disco óptico, onde entra o nervo óptico, e a foveola, centro de visão;
- Grupo B: Tumores maiores que 3 mm, mas que ainda estão próximos às estruturas citadas acima;
- Grupo C: Tumores bem definidos, com pequena dispersão sob a retina ou humor vítreo, material gelatinoso que preenche toda a cavidade intraocular;
- Grupo D: Tumores grandes com comprometimento do humor vítreo ou acometimento sub-retiniano.
- Grupo E: Tumor bastante grande, que se estende por toda a parte frontal do olho, podendo ser hemorrágico ou causar glaucoma, indicando a possibilidade de perda do olho.

A terceira classificação, Cancer Childhood Study Group (CCSG), avalia o estadiamento do tumor extraocular, dividido em 5 grupos descritos abaixo (Lira et al., 1995):

- Grupo I: Presença de células tumorais na emissária esderal ou em qualquer tecido epidérmico no momento da enucleação.
- Grupo II: Presença de células tumorais ao nível da secção cirúrgica do nervo óptico.
- Grupo III: Tumor orbitário comprovado por biópsia.
- Grupo IV: Células tumorais no líquido ou evidência de infiltração do sistema nervoso central.
- Grupo V: Metástase em medula óssea, em nódulos cervicais ou em qualquer região do sistema nervoso central.

O manejo de uma criança diagnosticada com retinoblastoma envolve, além da identificação do tumor e o estadiamento da doença, a tomada de decisão sobre o tratamento adequado, o acompanhamento cuidadoso do paciente e constatação de qualquer recorrência, inclusive de surgimento de tumores secundários em casos bilateral ou unilateral multifocal (Rao e Honavar, 2017).

As modalidades terapêuticas buscam salvar a vida da criança, preservar o olho afetado e otimizar a função visual (Ali et al., 2018). As terapias disponíveis para o tratamento deste tipo de tumor são: enucleação, termoterapia transpupilar (conhecida como TTT, é uma radiação infravermelha que provoca a hipertermia do tecido do tumor), crioterapia (substâncias que rebaixam a temperatura do tecido), laser, braquiterapia (terapia por aproximação ou inserção da fonte de radiação no paciente), radioterapia externa e quimioterapia intra-arterial (Rao e Honavar, 2017; Ali et al., 2018).

Em países desenvolvidos a taxa de cura é de 90% e nos países em desenvolvimento essa taxa vem atingindo 80% (Antoneli et al., 2003; Houston

et al., 2011). Essa menor taxa de cura pode ser explicada pelo diagnóstico tardio. O atraso no diagnóstico por mais de 6 meses após o aparecimento dos primeiros sinais da doença está associado a 70% de mortalidade em países em desenvolvimento (Dimaras et al., 2008; Li et al., 2016).

1.1.2 Retinoblastoma Trilateral

O retinoblastoma trilateral (RBT), inicialmente descrito em 1971, é definido como um retinoblastoma bilateral ou unilateral hereditário, associado ao desenvolvimento tumoral na região intracranial média, onde se localiza a glândula pineal ou, menos frequentemente, nas regiões supresselar e parasselar (Jurkiewicz et al., 2010; Jong et al., 2015).

Cerca de 5% das crianças com retinoblastoma, de origem mutacional germinativa do gene *RB1*, apresentam risco de desenvolver o tipo trilateral da doença (Jong et al., 2014), além de a possibilidade de ocorrência nos descendentes variar em torno de 1% a 7%, dependendo do histórico familiar (Cho et al., 2001).

O pinealoblastoma é uma forma maligna de tumor da região pineal, que se desenvolve em paciente com retinoblastoma hereditário bilateral, representando um tumor adicional ao retinoblastoma (Bader et al., 1980). Uma variante benigna é descrita por Beck et al. (2006), denominada de cisto pineal, identificada em pacientes com retinoblastoma trilateral, associada a casos hereditários da doença (Beck et al., 2006).

O retinoblastoma trilateral é detectado por exames de ressonância magnética, o que pode contribuir para o diagnóstico precoce, sendo o prognóstico bastante insatisfatório, com média de sobrevida em torno de 9 meses (Jurkiewicz et al., 2010; Dimaras e Corson, 2017). No entanto, a sobrevida de pacientes portadores do tipo trilateral da doença vem aumentando

nos últimos anos, mais notadamente com a introdução de novas terapias para o retinoblastoma (Dimaras e Corson, 2017).

Popovic et al. (2007) identificaram uma variação genotípica em um paciente do sexo masculino, aos 12 meses de idade, com retinoblastoma trilateral na região supresselar e com disseminação leptomeningeal espinhal, cisto pineal e múltiplas deficiências hormonais, porém, sem sinais clínicos de outra deficiência visual (Popovic et al., 2007). Essa variação corresponde a uma mutação sem sentido (*nonsense*) g.64248C>T no éxon 10 do gene *RB1*, causando a alteração de uma arginina para um códon de parada (*stop* códon) na posição 320 (R320X); no entanto, essa alteração não foi identificada em familiares do portador (Popovic et al., 2007).

São escassos os dados genéticos a respeito do tipo trilateral na literatura (D'Elia et al., 2013).

1.1.3 Testes genéticos

Com o objetivo de confirmar o diagnóstico clínico do retinoblastoma, são utilizados vários testes genéticos, como o sequenciamento Sanger, PCR quantitativa, testes citogenéticos, *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA) e *array*-CGH (Devarajan et al., 2015; Grotta et al., 2015).

O sequenciamento Sanger é muito usado para detectar mutações pontuais ao longo do gene *RB1* e pequenas deleções e inserções, sendo considerado técnica rotineira para diagnóstico de retinoblastoma (Devarajan et al., 2015). Quando esse rastreio inicial é negativo, são utilizados outros métodos para identificar grandes deleções e inserções, a exemplo da técnica de MLPA, PCR quantitativa multiplex e *array*-CGH (Devarajan et al., 2015; Galindo et al., 2015; Grotta et al., 2015).

Deleções e inserções encontradas em pacientes com retinoblastoma são investigadas por cariotipagem e *Fluorescence In Situ Hybridization* – FISH para as grandes deleções, e *Quantitative Multiplex Fluorescence PCR* -QMFP, MLPA e PCR em tempo real investigam pequenas, médias e grandes deleções (Kirchhoff et al., 2009; Stofanko et al., 2013). No entanto, cada técnica possui suas vantagens e limitações. A cariotipagem e o FISH podem detectar somente grandes rearranjos, maiores que 1 kb, incluindo a deleção gênica completa (Lakatosová e Holecková, 2007). Outros métodos como MLPA e PCR, em tempo real, baseiam-se na quantificação de produtos amplificados por PCR, sensíveis a baixas concentrações de DNA e permitem a detecção de deleções completa e parcial do gene (Ahani et al., 2013).

Atualmente, pacientes com baixo nível de mosaicismos podem ser identificados por meio do sequenciamento completo do genoma a partir de células do sangue (McEvoy e Dyer, 2015).

Com o desenvolvimento e avanço do sequenciamento de nova geração (NGS – *Next-Generation Sequencing*), é possível rastrear todo o gene e detectar todos os tipos de mutações, incluindo as grandes deleções (Singh et al., 2016). A vantagem do uso de NGS tem sido a rápida realização dos ensaios a partir de várias amostras, sequenciamento de vários genes ao mesmo tempo e elevada geração de dados (Devarajan et al., 2015; Grotta et al., 2015). Essa técnica permite, ainda, a detecção de baixos níveis de células em mosaico, em amostras de sangue, que podem não ser detectadas pelo método de sequenciamento Sanger (Li et al., 2016). No entanto, esse procedimento pode não ser economicamente acessível em todos os países.

1.2 Genética do retinoblastoma

O retinoblastoma é frequentemente ocasionado pela inativação de ambos os alelos do gene supressor tumoral *RB1*, localizado na região cromossômica 13q14.2 (Knudson, 1971; Rushlow et al., 2013).

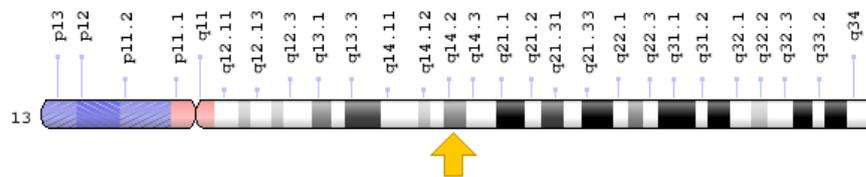


Figura 3: Cromossomo 13, *Homo sapiens*. Em destaque, a região onde se localiza o gene supressor tumoral *RB1*.

Fonte: NCBI, 2018.

Sessenta por cento (60%) dos casos são esporádicos, não hereditários, provenientes de mutações somáticas em células da retina. Possuem manifestação unilateral da doença e diagnóstico mais tardio, ocorrendo até aos 24 meses de idade (Mateu et al., 1997; Frenkel et al., 2016).

Os casos hereditários correspondem a 40%, apresentando-se de forma bilateral ou unilateral, com a presença de múltiplos focos tumorais, dadas as mutações germinativa e somática, diagnosticados mais precocemente até os 18 meses de idade e com possíveis manifestações tumorais extraoculares ao longo da vida (Mateu et al., 1997; Frenkel et al., 2016). Há uma predisposição especial ao desenvolvimento de sarcoma osteogênico (François, 1980). Segundo Thomas et al. (2001), a proteína RB, codificada pelo gene *RB1*, funciona como um coativador transcricional que promove a diferenciação e perda da capacidade proliferativa de osteoblastos, podendo contribuir para o direcionamento do osteossarcoma como neoplasias extraoculares em

pacientes com retinoblastoma hereditário (Thomas et al., 2001; OMIM #180200, 2018).

Um quarto das mutações germinativas (25%), que ocorrem nos casos bilaterais, é de origem familiar, com herança autossômica dominante e penetrância de 90%. As outras 75% de mutações germinativas são mutações *de novo*, não familiar, mas que podem ser herdadas pelos descendentes (Dommering et al., 2014; Galindo et al., 2015; Rao e Hononar, 2017).

Em todos os casos de retinoblastoma bilateral, os descendentes possuem 50% de chance de herdar o alelo mutado de um progenitor. Portanto, indivíduos com mutações germinativas possuem predisposição hereditária ao retinoblastoma. Assim, a detecção de mutações causadoras da doença é importante para estimar o risco de desenvolver o tumor na família do paciente (Parma et al., 2017).

Nos casos unilaterais, 90% correspondem a mutações não hereditárias e cerca de 10% a 15% dos casos decorrem das mutações *de novo* em células germinativas adquiridas durante a gametogênese, podendo ocorrer a forma unilateral multifocal (Dommering et al., 2014; Price et al., 2014; Ortiz e Dunkel, 2015).

Knudson (1971) postulou a hipótese para o desenvolvimento do retinoblastoma, conhecida como Teoria dos dois-eventos (*Two-hit hypothesis*), em que ambos os alelos do gene supressor tumoral estariam inativados (Figura 4). Na forma esporádica da doença, são necessários dois eventos mutacionais em uma mesma célula da retina; já na forma hereditária, o primeiro evento mutacional ocorre nas células germinativas, durante o desenvolvimento embrionário, e o segundo evento ocorre em uma célula da retina (Knudson, 1971).

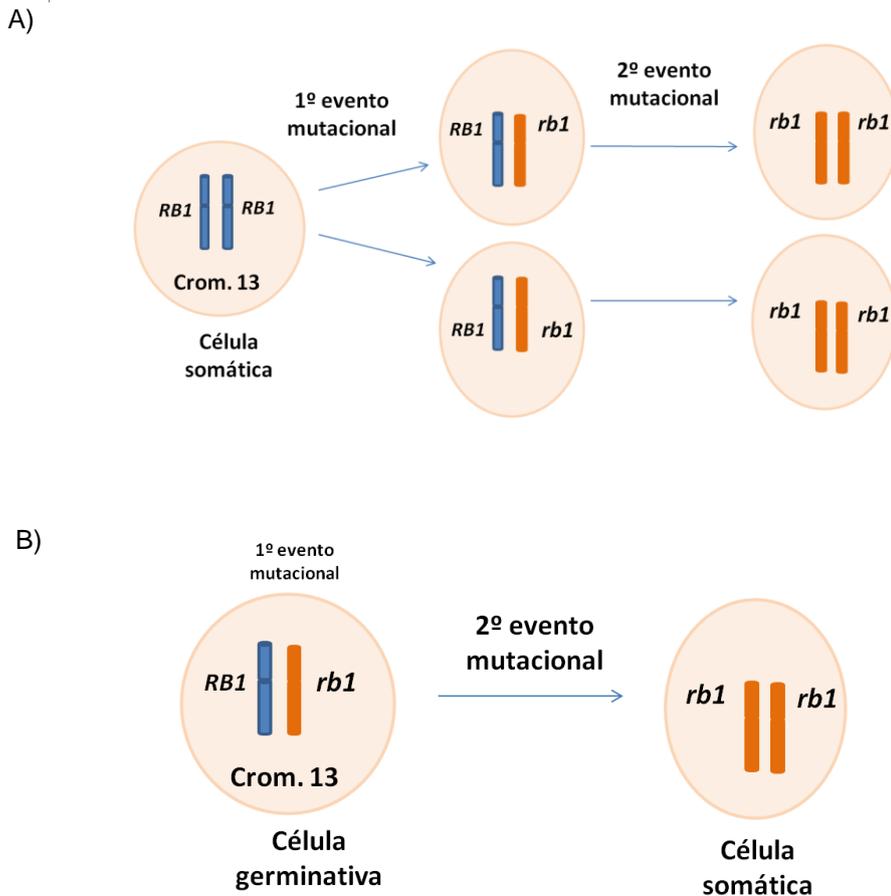


Figura 4: A) Retinoblastoma não hereditário: células não cancerosas, somáticas, não apresentam defeito em nenhuma cópia do gene *RB1*. O primeiro evento mutacional ocorre, inativando um dos alelos; posteriormente, um segundo evento mutacional ocorre na mesma célula somática, inativando o outro alelo *RB1*. B) Retinoblastoma hereditário: todas as células do organismo possuem a inativação de um dos alelos *RB1*, que sofreu o primeiro evento mutacional em uma das células germinativas; o desenvolvimento tumoral ocorrerá, quando o segundo evento mutacional ocorrer em uma célula somática da retina.
 Fonte: Adaptado de Benavante e Dyer, 2015.

A base genética para o desenvolvimento do retinoblastoma é principalmente aquela postulada por Knudson (1971). No entanto, mais recentemente, Rushlow et al. (2013) identificaram uma segunda forma genética para o desenvolvimento da doença, iniciado por amplificação do gene *MYCN*, observado em casos de retinoblastoma esporádicos, unilaterais. Esse proto-oncogene localiza-se na região cromossômica 2p24.3. Cerca de 1,5% a 2% dos casos unilaterais esporádicos podem ser explicados pela amplificação desse gene no tecido tumoral (Rushlow et al., 2013), sugerindo que *MYCN*

possa ser um importante direcionador da malignidade em casos esporádicos da doença (Dimaras e Corson, 2017).

Esse mecanismo de iniciação do retinoblastoma por *MYCN*, na ausência de inativação de *RB1*, foi demonstrado por sequenciamento completo do genoma, *Fluorescence In Situ Hybridization* - FISH e imunohistoquímica (McEvoy et al., 2014).

Além da inativação dos alelos do gene *RB1*, alterações genômicas adicionais estão relacionadas à progressão tumoral (Dimaras et al., 2008). Mais de 1.900 mutações em *RB1* são documentadas em banco de dados, incluindo mutações *missense*, *nonsense*, *splicing*, *frameshifts*, micro e macrodeleções, e metilação na região do promotor (Lohmann e Gallie, 2004; Nguyen et al., 2018; LOVD database, 2018).

As mutações no gene *RB1* são, principalmente, dispersas pelos seus 27 éxons, localizadas, também, em junções de união íntron-éxon, região promotora e em regiões intrônicas profundas (Lohmann, 1999). Mutações que resultam em códons de parada (mutações nulas ou *nonsense*) são, geralmente, associadas ao retinoblastoma de alta penetrância e acometem 90% de todas as mutações em *RB1*, enquanto mutações do tipo sentido trocado (*missense*), inserções, deleções e mutações em sítios de *splicing* estão associadas ao fenótipo de baixa expressividade e penetrância incompleta da doença (Lohmann, 1999; Kalsoon et al., 2015; Parma et al., 2017).

As mutações que ocorrem dentro de regiões intrônicas podem afetar sítios de *splicing*, resultando em retenção intrônica, perda de éxons e deslocamento de quadros de leitura (*frameshift*), resultando em uma proteína RB não funcional (Li et al., 2016).

Grandes deleções e duplicações em *RB1* representam 10% a 20% de mutações patogênicas encontradas em retinoblastoma. Normalmente, tais mutações necessitam de uma metodologia independente do sequenciamento por Sanger, tais como as técnicas de MLPA, PCR quantitativa, *array*-CGH ou NGS (Li et al., 2016). A hipermetilação de ilhas CpG, na região promotora do gene *RB1*, é observada em cerca de 10% dos casos de retinoblastoma

atuando como primeiro evento mutacional para o desenvolvimento do tumor (Lohmann, 1999). Trabalhos recentes demonstram dados de expressão gênica por desregulação epigenética de vários oncogenes e supressores tumorais em cânceres, bem como em retinoblastoma (Benavante e Dyer, 2015; McEvoy e Dyer, 2015).

O retinoma é considerado uma lesão benigna da retina, associada ao retinoblastoma, mas sem características malignas. Essas lesões foram inicialmente consideradas uma regressão espontânea do retinoblastoma. No entanto, evidências clínicas e histopatológicas não confirmam essa hipótese e sugerem que o retinoma representa um estágio anterior ao retinoblastoma e que pode conduzir ao desenvolvimento do tumor (Sampieri et al., 2009).

Kalsoon et al. (2015) explicam que mutações na forma hereditária da doença possuem expressividade variável e apresentam variabilidade fenotípica. Dada a baixa penetrância, um portador de mutação germinativa pode não desenvolver a doença. Em alguns casos, a expressividade reduzida poderia resultar no desenvolvimento do tipo unilateral do tumor ou em retinoma, em vez do retinoblastoma bilateral. Segundo os pesquisadores, a justificativa dessa baixa penetrância e menor expressividade seria uma alteração no sítio de tradução, ocasionado por uma mutação no domínio carboxi-terminal (C-terminal) da proteína em alelos de baixa penetrância que parcialmente inativam a proteína RB (Kalsoon et al., 2015).

Como em outros cânceres, vários micro-RNAs também são desregulados em retinoblastoma (Carvalho et al., 2016), incluindo os miR-17~92 e miR-106b~25 (Conkrite et al., 2011).

No tópico seguinte, são apresentadas as características associadas ao gene *RB1*, principal gene relacionado ao desenvolvimento do retinoblastoma.

1.3 O gene supressor tumoral *RB1*

Em 1986, o gene *RB1* foi identificado e clonado como o primeiro supressor tumoral por Friend et al. (Benavante e Dyer, 2015). Esse gene compreende mais que 178.143 kb do DNA genômico e é composto por 27 éxons que transcrevem um RNA mensageiro de 4.772 kb. A sequência completa do gene foi relatada por Toguchida et al. (1993) (Toguchida et al., 1993; Mateu et al., 1997; Kalsoon et al., 2015).

O gene *RB1* codifica uma proteína nuclear denominada pRB de 928 aminoácidos, pertencente à família *pocket*, que tem papel na regulação do ciclo celular (Toguchida et al., 1993; Mateu et al., 1997; Kalsoon et al., 2015).

O rastreamento de mutações no gene *RB1* deve ocorrer em todos os éxons, sendo as substituições de bases únicas e grandes deleções as mutações mais recorrentes. Muitas dessas mutações são do tipo sem sentido (*nonsense*) e *frameshift* (alteração no quadro de leitura dos nucleotídeos) (Ottaviani et al., 2015).

A maioria das substituições origina-se da transição de uma citosina para timina (C>T) no códon CGA no aminoácido arginina, gerando um códon de parada UGA, resultando em perda de função da pRB (Mateu et al., 1997; Khalid et al., 2015).

Mutações detectadas no gene *RB1* podem elevar a qualidade do gerenciamento clínico do retinoblastoma e permitir previsões de risco para todos os membros da família (Ahani et al., 2013).

A depleção completa do gene *RB1* leva a um aumento da instabilidade cromossômica, manifestado em aneuploidia ou poliploidia (Huang et al., 2015). Esse fenômeno é atribuído a uma disfunção centromérica e ao insucesso no recrutamento de componentes do complexo condensina II, que são proteínas responsáveis por manter as duas cromátides-irmãs unidas, levando ao defeito de separação cromossômica durante a mitose (Huang et al., 2015).

No entanto, a tumorigênese acontece quando vias de vigilância são inativadas, a exemplo da proteína p53 que impede a indução de apoptose na perda de função da pRB (Di Fiore et al., 2013).

A via de sinalização da proteína p53, codificada pelo gene *TP53*, localizado no cromossomo 17, é normalmente inativada em vários tipos de cânceres; aproximadamente, 50% de todos os tipos tumorais apresentam mutações no gene *TP53*, e aqueles que possuem o tipo selvagem da proteína p53 frequentemente apresentam mutações em outros genes da via de sinalização que permitem a vigilância do ciclo celular (McEvoy e Dyer, 2015).

Durante uma resposta de dano ao DNA, o gene *TP53* previne a proliferação celular através de vários mecanismos, como parada do ciclo celular e ativação da apoptose (Jiao et al., 2016).

Em retinoblastoma, é comum o gene *TP53* não ser mutado, e sim outros genes associados (Kato et al., 1996; McEvoy et al., 2012), em que a desregulação da p53 provém do aumento de expressão de genes reguladores como *MDM2* e *MDM4* (Figura 5) (Reis et al., 2013). As proteínas mdm2 e mdm4 podem impedir o efeito da p53, exercendo papel de reguladoras da p53, inibindo o controle do ciclo celular e impedindo a apoptose (Jiao et al., 2016).

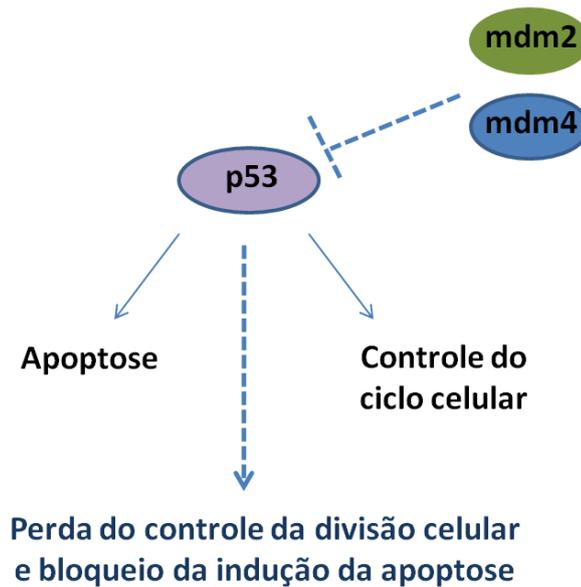


Figura 5: O funcionamento adequado da p53 é comprometido mediante o aumento da expressão de proteínas mdm2 e mdm4, em retinoblastoma, que inibem o controle da divisão celular e a indução à apoptose, promovendo a perda do controle da divisão celular e bloqueia a indução da apoptose.

Fonte: Dados da autora, 2018.

O aumento da expressão dos genes *MDM2* e *MDM4* pode ser ativado pelas ampliações somáticas em tumores ou polimorfismos germinativos, conduzindo a uma predisposição dos indivíduos ao câncer (Reis et al., 2013).

Além do aumento de expressão dos genes antagonistas da via de sinalização da p53, há diversas variantes de *splicing* na formação de RNAs mensageiros dos genes *MDM2* e *MDM4* que levam à repressão da p53 (McEvoy e Dyer, 2015).

No tópico seguinte, aborda-se a proteína RB, codificada pelo supressor tumoral *RB1*, como protagonista do ciclo celular. Ademais, esclarece-se a relação dessa proteína com o complexo formado por proteínas ciclinas e quinases, dependentes de ciclinas na condução e manutenção do ciclo celular em retinoblastoma.

1.4 A proteína RB e o controle do ciclo celular

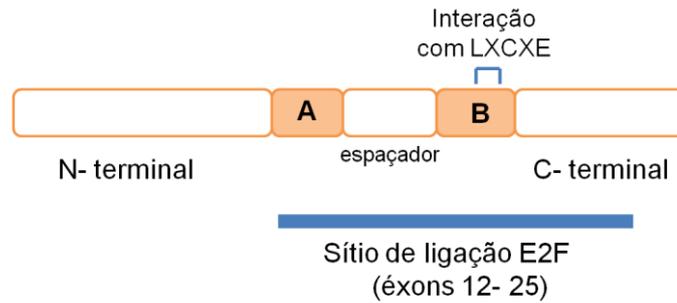
A tumorigênese resulta do descontrole na proliferação das células e de danos a genes envolvidos diretamente na regulação do controle do ciclo celular (Ma et al., 2006).

A parada do ciclo celular permite que reparos no DNA e erros de replicação sejam realizados, a fim de evitar o desequilíbrio entre crescimento e diferenciação terminal, e também a instabilidade genômica, que podem facilitar o surgimento de cânceres (Ma et al., 2006).

A proteína RB (pRB) atua como reguladora das fases G1/S do ciclo celular e possui a habilidade em regular a transcrição gênica de genes que participam da apoptose, diferenciação e adesão celular (Dyson, 2016; Vélez-Cruz e Johnson, 2017).

Essa proteína pertence a uma família de proteínas, codificadas por três diferentes genes: o gene *RB1*, que codifica a pRB; o gene *RBL1*, localizado na região cromossômica 20q11.2, que codifica a p107 e o gene *RBL2*, localizado no braço longo do cromossomo 16, que codifica a p130 (Henley e Dick, 2012; Di Fiore et al., 2013). Todos os membros da família de proteínas RB possuem uma região conservada, denominada '*pocket*', que interage com o motivo LXCXE, encontrado em proteínas virais, utilizado para se ligar a pRB. Deleções ou mutações pontuais nesse domínio tornam as oncoproteínas incapazes de inativar a pRB e potencializam células em alvos tumorais (Dahiya et al., 2000).

Essas proteínas, conhecidas como "*pocket*", são formadas por 3 domínios: N-terminal, A/B *pocket* e C-terminal (Henley e Dick, 2012). A funcionalidade das proteínas está relacionada aos domínios de ligação ao fator transcrinal E2F (*elongation fator 2*) (Kalsoon et al., 2015). Na Figura 6, é mostrada a localização de cada domínio que estrutura a proteína.



**Pocket*: compreende os sítios A, espaçador, B e C-terminal.

Figura 6: Estrutura das proteínas membro da família *pocket*. Os éxons 12- 25 estão localizados na região de ligação ao fator transcricional E2F (*elongation fator 2*).
Fonte: Dados da autora, 2018.

Células que expressam a pRB mutante, sem o domínio de interação LXCXE, mostraram estruturas da cromatina anormais, incluindo descondensação da cromatina e cromossomos frouxos (Uchida, 2016). Esses dados indicam que a pRB também regula a remodelagem da cromatina, predominantemente nas fases G0 e G1 do ciclo celular (Longworth e Dyson, 2010).

As proteínas p107 e p130 exercem a função de reguladoras da repressão de genes alvo do E2F. No entanto, tais proteínas são pouco mutadas em cânceres humanos (Vélez-Cruz e Johnson, 2017). Estudos em camundongos mostraram que o *RB1* é um gene essencial às células, sendo que camundongos *knockout* morrem durante o desenvolvimento embrionário. Por outro lado, camundongos *knockout*, para os genes das proteínas p107 e p130, desenvolvem-se, normalmente, sugerindo que tais proteínas não podem substituir todas as funções da pRB e que esta de fato é vital para a sobrevivência do organismo (Vélez-Cruz e Johnson, 2017).

Na fase quiescente das células (G0), a proteína mais abundante é a p130; posteriormente, as células são estimuladas a iniciar o ciclo celular, e as proteínas pRB e p107 são induzidas (Henley e Dick, 2012). Com isso, quando as duas começam a ter seus níveis aumentados de expressão, os níveis da p130 vão reduzindo (Tabela 1). Alguns estudos apontam p130 como um repressor transcricional parcial denominado DREAM, e funciona para reprimir

as funções de genes alvo do E2F durante a fase G0 (Henley e Dick, 2012; Engeland, 2018).

Tabela 1: Complexos RB-E2F prevalentes durante cada fase do ciclo celular

Membro da família RB	Fatores de transcrição	Estágio do ciclo celular
pRB	1, 2, 3	G0, G1, S
p107	4, 5	G1, S, G2
p130	4, 5	G0, G1

Fonte: Adaptada de Henley e Dick, 2012.

O início da transcrição gênica em eucariotos requer que fatores proteicos transcripcionais, juntamente com a RNA polimerase, formem um aparato de transcrição basal para dar início à transcrição gênica (Pimentel et al., 2013).

O fator de transcrição E2F foi, inicialmente, identificado como componente celular necessário para a região anterior (região E1A) da proteína de adenovírus, com a finalidade de mediar a ativação transcripcional da região promotora viral (região E2) (Yee et al., 1987).

Chellappan et al. (1991) deduziram o mecanismo de regulação do E2F por ativação da região E1A de adenovírus, possibilitando o entendimento de que o fator de transcrição é inibido, quando associado à proteína RB. Essa observação foi a primeira a sugerir que o E2F poderia estar relacionado com o desenvolvimento do câncer (Chellappan et al., 1991). Identificou-se, posteriormente, que a pRB é alvo de outras oncoproteínas virais, incluindo SV40 de antígeno T e proteínas E6 e E7 do *Papilomavírus humano* (HPV) (Sellers e Kaelin, 1997; Bell et al., 2004).

Estudos subsequentes demonstraram que o E2F controla a transcrição de genes que são fundamentais para a divisão celular (Bell et al., 2004).

Isso significa que a proteína viral E7, do HPV, é capaz de se ligar a pRB e torná-la inativa; com isso, o fator E2F fica livre, gerando um estímulo para a proliferação celular (Figura 7 – B). Acresce-se que a associação da proteína E7 com a pRB leva ao aumento da p53 que causa a parada do ciclo celular ou induz à apoptose (Fischer et al., 2017). No contexto da infecção com HPV, a oncoproteína E6 inicia a degradação da p53, proporcionando a perda do controle da proliferação celular e o bloqueio na ativação da apoptose (Fischer et al., 2017). Na Figura 7, demonstra-se a associação da proteína RB com o fator E2F e também com a oncoproteína viral (Figura 7 – B).

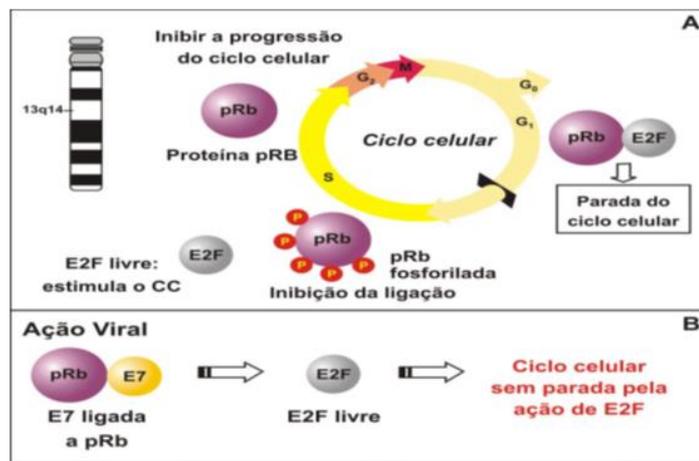


Figura 7: Ação das proteínas pRB e E7 viral no ciclo celular. A) A ligação da pRB ao fator E2F resulta na parada do ciclo celular. A fosforilação da pRB libera o fator E2F que ativa a transcrição gênica para a replicação do genoma. B) A proteína viral E7 se liga a pRB, deixando o fator E2F livre, causando o estímulo constante à divisão celular. Fonte: <http://bioqdocancer.blogspot.com.br>, 2018.

A relação da pRB na progressão do ciclo celular é associada a oito membros da família de fatores transcricionais E2F (E2F1 a E2F8) que são reguladores centrais da progressão do ciclo celular. As pRB formam heterodímeros com uma subunidade codificada por membros da família DP – DP1 e DP2, gerando uma especificidade de ligação ao DNA, determinada, principalmente, pela subunidade de E2F (Figura 8) (Dyson, 2016; Vélez-Cruz e Johnson, 2017).

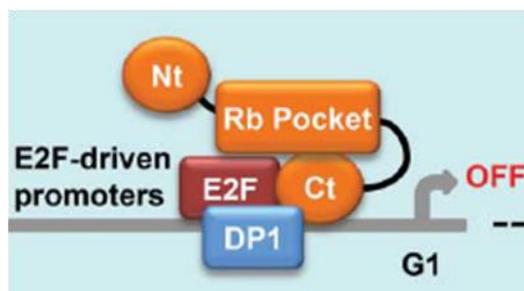


Figura 8: A pRB hipofosforilada associa-se a promotores gênicos e ao E2F, inibindo a transcrição através do domínio *pocket*.
 Fonte: Joaquin et al., 2017.

Os fatores E2F1, E2F2 e E2F3 são associados à ativação transcricional e possuem a pRB como alvo; E2F4 e E2F5 são repressores transcricionais e são alvos da p107 e p130, enquanto E2F6, E2F7 e E2F8 são repressores independentes de pRB (Longworth e Dyson, 2010). O fator E2F1 desenvolve importante papel na indução de apoptose e é encontrado frequentemente amplificado em cânceres humanos (Vélez-Cruz e Johnson, 2017).

Embora o modelo aceito para o complexo pRB-E2F preveja que pRB fosforilada por quinases dependentes de ciclinas (CDKs) libere os fatores de transcrição E2F, durante a transição do ciclo celular G1/S, observou-se que os complexos pRB-E2F1 persistem associados além da fase S, independentemente da fosforilação de pRB. Esse complexo ocupará regiões promotoras de genes apoptóticos de células em proliferação (Indovina et al., 2015).

Assim, essas observações indicam que a fosforilação de pRB por CDKs, durante a transição G1/S, causa a liberação da maioria dos fatores E2F para induzir a transcrição de genes do ciclo celular, mas os complexos pRB-E2F1 permanecem estáveis graças à interação desse complexo às regiões promotoras de genes apoptóticos, reprimindo sua expressão (Dick e Rubin, 2013; Indovina et al., 2015).

DeGregori (1997) sugere que a apoptose induzida por E2F1 não seja simplesmente uma consequência de anormalidade na fase S, mas que representa uma propriedade intrínseca do E2F1 em ativar genes que iniciam a

morte celular programada. É possível que essa habilidade do E2F1 faça com que ocorra interação, direta ou indireta, com outras proteínas que participam da via apoptótica, incluindo a p53. Assim, os resultados apresentados por DeGregori (1997) sugerem a capacidade do E2F1 em induzir um acúmulo de p53, atuando na fase G1 do ciclo celular, promovendo o controle e a diferenciação das células (Perri et al., 2016).

As proteínas da família RB são ativadas por fosforilação de quinases dependentes de ciclinas (CDKs), que se dividem em três classes - CDK2, CDK4 e CDK6. As CDK2 associam-se a ciclinas do tipo A e E; as classes CDK4 e CDK6 são associadas às ciclinas do tipo D (D1, D2 e D3), sendo responsáveis por iniciar a fosforilação da pRB (Henry e Dick, 2012). Estas atuam na manutenção das células na fase G1 do ciclo celular, pois favorecem a manutenção do complexo pRB-E2F (Henry e Dick, 2012). O complexo CDK2/ciclina E promovem a progressão do ciclo da fase G1 para a fase S, e a CDK2/ciclina A é responsável por manter a progressão do ciclo celular após a fase S (Figura 9) (Knudsen et al., 2008).

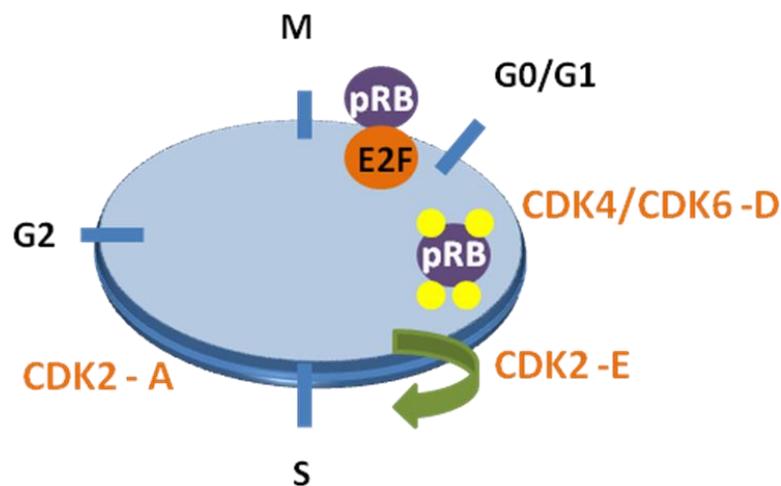


Figura 9: Representação das classes e dos tipos de quinases dependentes de ciclinas (CDKs) que são fosforiladas, quando associadas às ciclinas em cada etapa do ciclo celular. O complexo CDK2/ciclina E (destaque com a seta verde) tem atuação fundamental na progressão de G1 para a fase S. O complexo CDK2 / ciclina A mantém a progressão após a fase S. Fonte: Dados da autora, 2018.

Em sua forma ativa, a pRB é hipofosforilada em G0/G1 e associada ao fator transcricional E2F, bloqueando o ciclo celular (Figura 9). Fatores extracelulares que direcionam a mitogênese das células induzem a ativação de quinases dependentes de ciclinas (CDKs) das classes CDK2 e CDK4/CDK6 que promovem a fosforilação da pRB (Sellers e Kaelin, 1997).

Uma vez fosforilada, a proteína RB tem sua ligação ao fator E2F enfraquecido e ocorre a dissociação dessas moléculas, permitindo, assim, o início e a progressão para a fase S do ciclo celular (Bell et al., 2004; Ganguly et al., 2010).

Com a progressão do ciclo celular, a atividade das CDKs é diminuída ou inibida por outro grupo de proteínas denominadas de inibidoras de quinases dependentes de ciclinas (CKI), permitindo que a pRB seja hipofosforilada e formado um novo complexo pRB-E2F, capaz de reprimir a transcrição gênica e a progressão do ciclo celular (Vélez-Cruz e Johnson, 2017). Na Figura 10, estão demonstradas as CKIs, dentre elas a p27 e p21, inibindo as CDKs e restabelecendo o complexo pRB-E2F com a hipofosforilação da proteína.

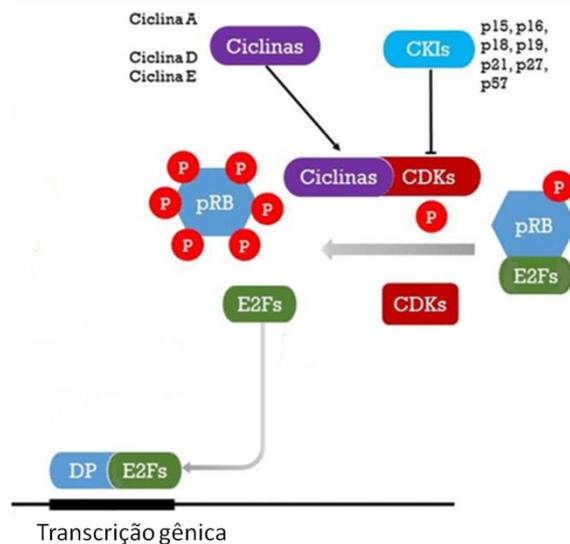


Figura 10: A regulação do ciclo celular mediante a fosforilação da pRB permite a divisão celular e transcrição gênica mediante liberação do fator E2F. As CKIs bloqueiam o complexo ciclina-CDK, interrompendo o ciclo celular, levando à hipofosforilação da pRB e ao restabelecimento do complexo pRB-E2F.

Fonte: Adaptada de Aguilar e Fajas, 2010.

Essa regulação desencadeada por CDKIs na progressão do ciclo celular é o principal mecanismo pelo qual a pRB reprime o desenvolvimento tumoral (Vélez-Cruz e Johnson, 2017). No entanto, a pRB interage com centenas de proteínas que são fundamentais para múltiplos processos, além do controle do ciclo celular (Vélez-Cruz e Johnson, 2017).

Estudos sugerem que o E2F também pode ligar-se a múltiplos sítios promotores, regulando dinamicamente a codificação de genes importantes para o reparo de DNA, remodelagem da cromatina e segregação cromossômica (Crosby et al., 2004).

Os genes que contribuem para a síntese de proteínas que permitem a divisão celular funcionam como proto-oncogenes, e aqueles que inibem a divisão das células funcionam como genes supressores de tumor. Dessa forma, as proteínas E2F e as CDKs são transcritas a partir de oncogenes, enquanto a pRB e as CDKIs são codificadas por supressores tumoral (Alberts et al., 2010).

Segue-se a apresentação de outro fenótipo relacionado ao retinoblastoma, denominado de síndrome 13q, que envolve deleções na região cromossômica 13q14, incluindo o gene *RB1*.

1.5 Deleções do gene *RB1* e região cromossômica 13q14

Deleções envolvendo o gene *RB1*, localizado na região cromossômica 13q14, são conhecidas por serem relacionadas a uma síndrome que envolve genes contíguos, caracterizada por anormalidades neurológicas e psicomotoras (Albrecht et al., 2005).

A síndrome da deleção 13q, como é conhecida, pode envolver outros genes além do *RB1*, e anormalidades de desenvolvimento neurológico, em

associação com fenótipos faciais distintos, são correlacionadas com o tamanho da deleção 13q. No entanto, pequenas deleções limitadas à banda 13q14 são associadas ao desenvolvimento neurológico normal durante a infância (Baud et al., 1999).

Duas formas sindrômicas são associadas com deleções, envolvendo regiões diferentes do braço longo do cromossomo 13; uma delas é causada por uma deleção distal que envolve a banda q32 e é fenotipicamente caracterizada pela presença de retardo mental severo, malformações e anomalias digitais. A outra decorre da deleção proximal que envolve a banda q14 e é associada ao retinoblastoma e retardo mental (Figura 11) (Caselli et al., 2007).

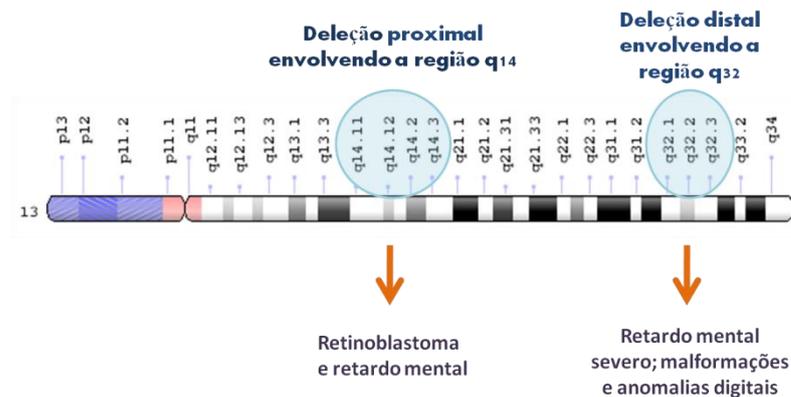


Figura 11: Cromossomo 13. Em destaque, as regiões envolvidas na síndrome 13q e seus principais fenótipos.
Fonte: Dados da autora, 2018.

Cerca de 5% a 10% de pacientes com retinoblastoma possuem deleções no braço longo do cromossomo 13 (Brennan et al., 2016). A distribuição das deleções ao longo do gene *RB1* não mostra ocorrências repetidas de deleções específicas com pontos de quebras intragênicos (Albrecht et al., 2005).

Motegi (1983) foi o primeiro autor a sugerir fenótipos faciais específicos para caracterizar a deleção 13q14; Baud et al. (1999) definiram as principais características dismórficas da síndrome da deleção 13q14, a partir de um estudo em uma coorte de 22 pacientes com anormalidades variadas que incluía testa alta e larga, lóbulos grossos da orelha, nariz curto, linha mediana

do lábio superior proeminente e lábio inferior espesso (Baud et al., 1999; Caselli et al., 2007).

Em 1980, Matsunaga et al. correlacionaram a maior proporção de casos de retinoblastoma unilateral com aqueles que carregavam a deleção 13q comparada a outros pacientes com retinoblastoma hereditário (Albrecht et al., 2005). Seguindo o mesmo entendimento, Bunin (1989) identificou pacientes com deleções no gene *RB1* na linhagem germinativa, tendo sido mais recorrente o retinoblastoma unilateral, comparando-se a outros pacientes com retinoblastoma hereditário, que normalmente desenvolvem a forma bilateral da doença (Dehainault et al., 2014).

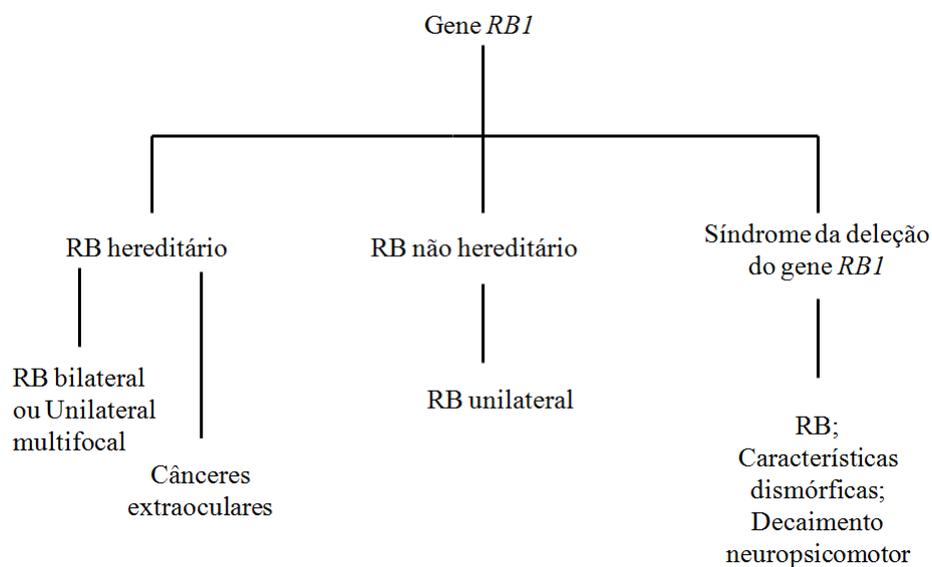
O gene *SUCLA2*, localizado na região cromossômica 13q14.2, codifica a subunidade beta da succinil-CoA sintetase (SCS-A), presente na matriz mitocondrial (OMIM #603921). Essa enzima faz parte do ciclo do ácido tricarbóxico (ou do ácido cítrico), descrito pela primeira vez por Hans Krebs, em 1937. Mutações homozigóticas em *SUCLA2* foram identificadas pela primeira vez em uma família israelense com encefalomiopatia mitocondrial recessiva, associadas à depleção de mtDNA, levando a um comprometimento multissistêmico (Lamperti et al., 2012).

A proximidade entre os genes *SUCLA2* e *RB1* pode levar a ocorrência de encefalomiopatia mitocondrial e retinoblastoma bilateral, conforme constatado no estudo de Maitilainen et al. (2015). Em um grupo de 42 pacientes com retinoblastoma e fenótipos variados devido à deleção 13q, 27 pacientes tiveram deleção, envolvendo os genes *RB1* e *SUCLA2*. Dessa forma, os autores propuseram que o *SUCLA2* pode ser considerado uma causa para deficiências neurológicas em pacientes com retinoblastoma e deleções na região 13q14, especialmente nos casos em que há comprometimentos psicomotores e neurológicos (Maitilainen et al., 2015).

Outro gene adjacente à região 13q14, *MED4*, é um mediador do complexo multiproteico, requerido por fatores de transcrição e pela RNA polimerase II para ativação gênica, funcionando como um coativador nuclear (OMIM #605718). O fenótipo moderado para a síndrome 13q foi visto em pacientes com retinoblastoma e deleções maiores que 1 Mb (Mitter et al.,

2011). No referido estudo, foram observados 27 probandos com deleção, envolvendo os genes *MED4* e *SUCLA2* com 9 casos (33%) de deleções associadas à forma unilateral do retinoblastoma ou sem a doença. Assim, deleções incluindo o *MED4* estão associadas a uma manifestação fenotípica moderada das características da síndrome 13q (Mitter et al., 2011). No mais, esse gene tem sido considerado um gene de sobrevivência ao desenvolvimento do retinoblastoma (Eloy et al., 2016), contribuindo para a baixa penetrância em pacientes com grandes deleções, incluindo os genes *MED4* e *RB1* (Dehainault et al., 2014).

Contudo, as patologias causadas por alterações no gene *RB1*, associadas ao retinoblastoma, podem ser resumidas em três grupos distintos:



Fonte: Adaptado de Rao e Honavar, 2017.

1.6 O gene *CDKN1B*: um inibidor de quinase dependente de ciclina

O gene *CDKN1B*, também conhecido como p27/Kip1 (p27), localizado na região cromossômica 12p13, codifica o inibidor de quinase p27. Essa proteína tem a função de regular a progressão do ciclo celular, mantendo as células na fase G1, impedindo o avanço do ciclo (Cheng et al., 2017). Nesse sentido, a p27 inibe diretamente as quinases dependentes de ciclinas do tipo CDK4/6 e CDK2/E, que atuam na progressão da fase G1 para a fase S, mantendo o complexo pRB-E2F. A p27 é uma CDKI, mostrada na Figura 10. Desse modo, não ocorre a liberação do fator de transição E2F que não permite o avanço das células pelo ciclo celular (Figura 12) (Cheng et al., 2017).

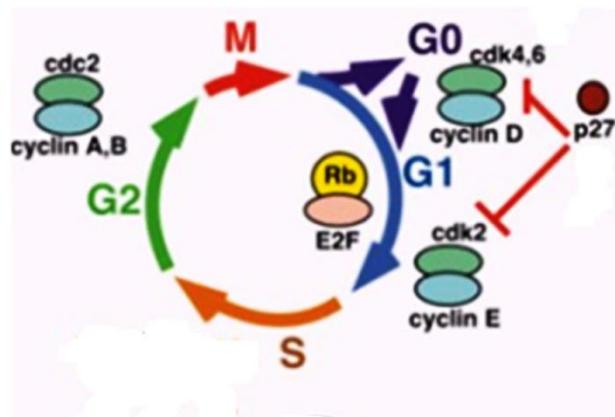


Figura 12: Representação da proteína inibidora de quinase, dependente de ciclina p27, codificada pelo gene *CDKN1B*, bloqueando a fosforilação das CDK4/6 e CDK2. O avanço pelo ciclo celular é impedido, pois o complexo pRB-E2F é mantido.

Fonte: <https://geneticaufc.wordpress.com>, 03-05-2018.

A ativação e repressão do complexo ciclina-CDK são reguladas pelo sítio N-terminal da p27 (CDKI), que impede a ligação da molécula de adenosina trifosfato (ATP), ao bloquear fisicamente e alterar estruturalmente o sítio catalítico da CDK, evitando a fosforilação do complexo ciclina-CDK e subsequentemente o rompimento do complexo pRB - E2F (Lee e Kim, 2009).

Na Figura 13, apresenta-se o funcionamento desse mecanismo de regulação pela p27.

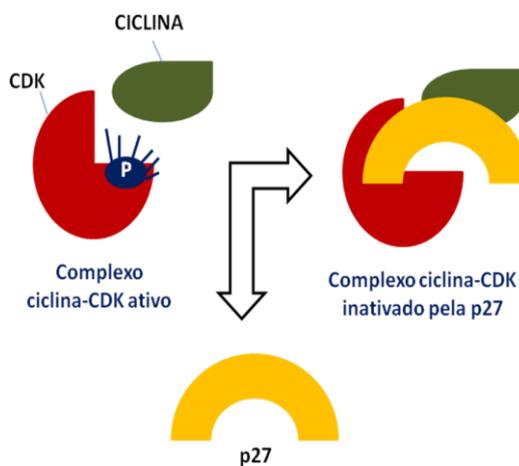


Figura 13: A proteína p27 inibe o complexo ciclina-CDK por alterar e bloquear o sítio catalítico de ativação da CDK, impedindo a fosforilação do complexo.
Fonte: Dados da autora, 2018.

Desse modo, a ativação do complexo ciclina-CDK é regulada pelo acúmulo de ciclinas e pela fosforilação e defosforilação de componentes específicos desse complexo que permitem o controle de todo o ciclo celular (Lee e Kim, 2009). A ausência da p27 durante a fase G1 permite que os complexos de ciclinas e quinases sejam ativados na transição das fases G1/S e ocorra a progressão do ciclo celular (Wander et al., 2012; Freitas et al., 2018 No prelo).

Em G1, os níveis de expressão da p27 são relativamente altos e a atividade da CDK2/E é baixa. Isso previne a síntese de DNA e consequentemente a divisão celular (Henry e Dick, 2012). A perda do controle do ciclo celular é extremamente alarmante por contribuir para o desenvolvimento de malignidades como o câncer (Cheng et al., 2017).

O papel fundamental do gene *CDKN1B* na regulação da proliferação celular e como supressor tumoral foi demonstrado em camundongos *knockout* que apresentaram gigantismo por causa do aumento do número celular e aumento da tumorigênese (Chang et al., 2004).

A inativação da p27 não provém de mutações no gene *CDKN1B* ou silenciamento epigenético, como ocorre tipicamente em genes supressores tumorais. A p27 é inativada em tumores por modificações pós-traducionais que resultam em uma regulação alterada da proteína (Vervoots e Lüscher, 2008).

Em células normais, os níveis da proteína p27 são controlados por proteólise e dependem de ubiquitinação. Após estímulo mitogênico, a p27 é liberada dos complexos CDK2/E, e essa dissociação ativa a CDK2, a qual, por sua vez, fosforila a pRB (Pellegata, 2012). Após a dissociação da p27 com o complexo CDK2/E no início de G1, uma porção de p27 é fosforilada em serina 10 e exportada para o citoplasma através da interação com a exportina (CRM1) (Hnit et al., 2015). Uma vez no citoplasma, a p27 é ubiquitinizada pelo complexo KPC1/KPC2 e degradada pelo proteassoma (Figura 14) (Pellegata, 2012; Wander et al., 2012).

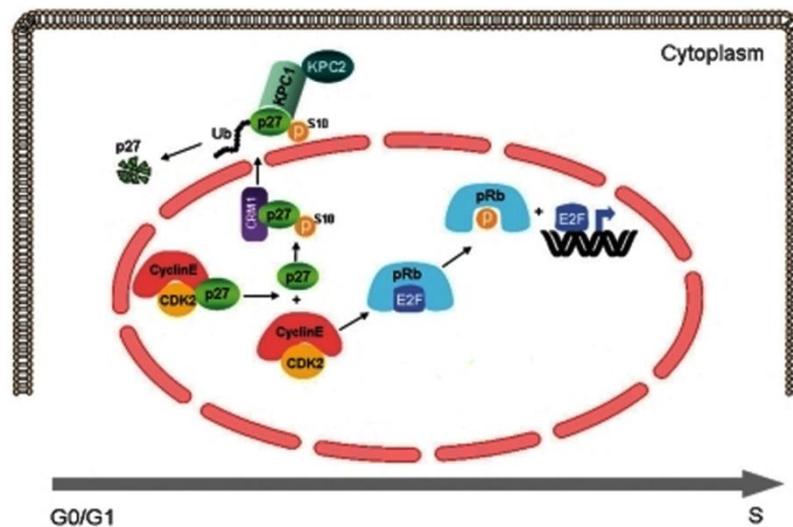


Figura 14: Representação gráfica das interações nucleares e citoplasmáticas de p27. Fonte: Pellegata, 2012.

A p27 é raramente mutada em cânceres (Li et al., 2004). Baixos níveis de expressão do gene *CDKN1B* estão relacionados com a tumorigênese e o avanço do estágio clínico em vários tumores, tais como, de próstata, gástrico, laríngeo, colorretal, carcinoma medular da tireoide e mama. Na Figura 15,

estão descritos os baixos níveis proteicos da p27 que interferem no funcionamento adequado do ciclo celular.

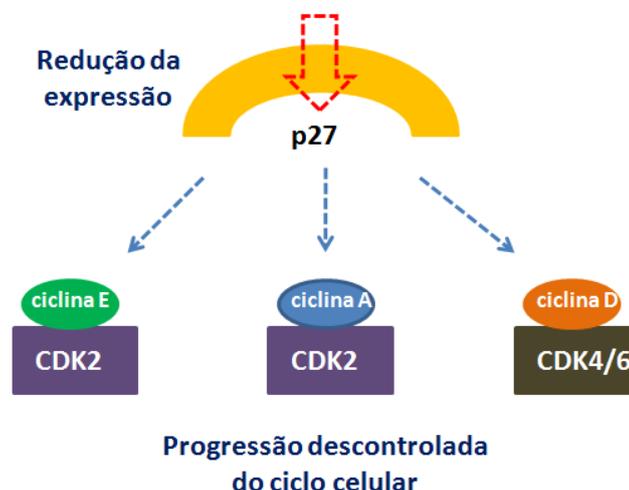


Figura 15: A diminuição dos produtos proteicos p27 interfere na inativação dos complexos ciclina-CDK, em cada fase do ciclo celular, reduzindo os níveis de controle de cada etapa e resultando em uma divisão celular desregulada.

Fonte: Dados da autora, 2018.

1.6.1 Polimorfismos no gene *CDKN1B*

Os polimorfismos são variações genéticas encontradas no genoma humano, em pelo menos 1% da população, sendo os polimorfismos de base única (SNPs – *Single Nucleotide Polymorphism*) a classe mais frequente de polimorfismos que surgem de alterações em um único nucleotídeo de uma determinada sequência de DNA, a partir de mutações pontuais que são seletivamente mantidas em uma determinada população. Os SNPs estão distribuídos por todo o genoma, o que os torna excelentes marcadores biomoleculares (Alberts et al., 2010). Por definição, um SNP apresenta MAF (*minor allele frequency*, frequência do alelo minoritário) maior que 1%, em pelo menos uma população (Risch et al., 2000). O MAF é calculado com base no tempo em que ocorreu a determinada mutação, a pressão evolutiva que depende do significado biológico da variação, a deriva genética e eventos do tipo “gargalo de garrafa” (Erichsen, 2004; Carvalho, 2017).

Alguns SNPs nesse gene estão associados à reduzida taxa de transcrição e baixos níveis de expressão proteica, levando à desregulação do ciclo celular e a um comportamento neoplásico das células (Li et al., 2004; Barbieri et al., 2014; Lu et al., 2015). Polimorfismos de base única, como os rs2066827 (109 T/G) e rs34330 (-79 C/T) no gene *CDKN1B*, foram identificados e são estimados por conferir susceptibilidade ao risco de câncer (Wei et al., 2012; Xiang et al., 2013; Lu et al., 2015; Cheng et al., 2017).

O polimorfismo rs2066827, localizado no éxon1 do gene *CDKN1B*, resulta em uma transversão de timina para guanina (T>G) no códon 109 que causa uma alteração na sequência de aminoácidos de valina para guanina (T326G, V109G), podendo alterar a eficiência da transcrição e níveis proteicos, levando à desregulação do ciclo celular e à correlação com susceptibilidade ao desenvolvimento de tumores (Lu et al., 2015). Landa et al. (2010) sugerem que o polimorfismo rs2066827 esteja associado à reduzida taxa de transcrição e aos baixos níveis proteicos de p27 com susceptibilidade ao desenvolvimento dos cânceres de tireoide e próstata (Chang et al., 2004; Landa et al., 2010).

Atualmente, outros estudos têm demonstrado esse aumento à susceptibilidade ao câncer do polimorfismo rs2066827 (Lu et al., 2015; Hossian et al., 2017). Por outro lado, a perda da expressão de p27 tem sido descrita como evento frequente em vários cânceres humanos, conferindo uma vantagem proliferativa que pode levar à formação do tumor (Landa et al., 2010).

Em alguns tipos de tumores, a p27 não apresenta seus níveis reduzidos apenas no núcleo das células, mas também exibem localização citoplasmática, podendo adquirir uma função oncogênica, independentemente do ciclo celular para promover a invasão de células cancerígenas (Chu et al., 2008; Wander et al., 2012). De acordo com Vervoorts e Lüscher (2008), o decaimento no acúmulo de p27, no citoplasma, poderia reduzir a ativação do complexo CDK4/6-ciclina D e, em paralelo, poderia inibir o outro complexo CDK2-ciclina E, e, desse modo, evitar a progressão do ciclo celular (Vervoorts e Lüscher, 2008).

Por outro lado, a concentração de p27 no citoplasma aumenta a metástase tumoral em modelos murinos e promove a invasão de células de glioma. De tal modo, enquanto a p27 nuclear inibe os complexos CDK – ciclina, para conter o ciclo celular, a p27 em excesso no citoplasma pode ter um efeito oncogênico e promover a invasão e metástase celular (Chu et al., 2008; Wander et al., 2012).

Essa proteína foi identificada na associação da síndrome da neoplasia endócrina múltipla (MENX), uma doença autossômica dominante, com mutações de perda de função germinativa no gene *CDKN1B* em camundongos. Estudos de expressão para a p27 mostraram ausência ou redução da presença em tecidos normais e patológicos desses camundongos (Tonelli et al., 2014).

Estudos *in vitro* em culturas celulares demonstraram, além disso, que a proteína p27 mutante mantém algumas propriedades da proteína selvagem, como a localização nuclear e a interação com CDK2, mas é altamente instável e degrada rapidamente (Tonelli et al., 2014).

Como a p27 tem sido alvo de vários estudos em cânceres (Cheng et al., 2017), no presente estudo, avaliou-se o polimorfismo rs2066827, em portadores de retinoblastoma, pois não se encontram na literatura estudos relacionados.

2. Hipóteses

A partir do conhecimento da doença do retinoblastoma e da literatura bibliográfica disponível, buscamos não apenas detectar as deleções envolvendo o gene *RB1*, mas revisar os casos descritos na literatura a fim de compreender como as deleções em genes da região 13q14 interferem no fenótipo do paciente com retinoblastoma. Ainda, buscamos avaliar neste trabalho o possível efeito no fenótipo de portadores com retinoblastoma associado a um polimorfismo de base única, localizado no gene *CDKN1B*, que possa indicar uma associação de susceptibilidade ou efeito protetor em relação ao SNP e ao desenvolvimento ou manifestação do retinoblastoma. Logo, nosso trabalho se apoia com base em duas hipóteses:

1. A bilateralidade é um fenótipo marcadamente presente nas deleções intragênicas envolvendo o gene *RB1*?
2. O polimorfismo rs2066827, localizado no éxon1 do gene *CDKN1B*, altera a manifestação fenotípica em portadores de retinoblastoma, como sugere alguns trabalhos para outros tipos tumorais?

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

- Realizar caracterização genotípica e fenotípica de portadores de retinoblastoma com deleção parcial ou completa do gene *RB1* e da região 13q14, e investigar a contribuição de polimorfismos no gene *CDKN1B* como modificadores de fenótipo em portadores de retinoblastoma.

3.2 Objetivos Específicos

- Rastrear mutações germinativas no gene *RB1* em portadores de retinoblastoma por meio da técnica de sequenciamento automático Sanger, e associar os achados genotípicos identificados com variáveis fenotípicas, tais como lateralidade do tumor, idade ao diagnóstico, histórico familiar, estadiamento da doença, principais sinais e sintomas.
- Avaliar os efeitos *in silico* de variantes identificadas no rastreamento do *RB1*.
- Realizar modelagens moleculares comparativas para as mutações germinativas identificadas nesses pacientes, a fim de investigar quais estruturas da proteína retinoblastoma (pRB) são alteradas nesses pacientes.
- Desenhar e validar por meio da técnica de PCR quantitativa as deleções parciais e completas, identificadas previamente em pacientes com retinoblastoma, por meio da técnica de MLPA (*Multiple Ligation Probe Amplification*) no gene *RB1* e nos genes adjacentes – *SUCLA2* e *MED4*, localizados na região cromossômica 13q14.

- Observar a proporção de casos com deleção completa e parcial, buscando rastrear os pontos de quebra neste último caso. Além disso, estabelecer possíveis associações entre a extensão das deleções genômicas com a lateralidade tumoral envolvendo os genes investigados.
- Estimar a prevalência do polimorfismo rs2066827, localizado no éxon1 do gene *CDKN1B*, em portadores de retinoblastoma.
- Observar se a coorte de portadores da doença e o grupo controle estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg e se as frequências alélicas de cada um são significativas, estatisticamente, que possa indicar uma associação com a manifestação do retinoblastoma.

4. Material e Métodos

4.1 Caracterização da amostra

Nosso estudo foi realizado em uma coorte de 148 pacientes diagnosticados com retinoblastoma, divididos em dois grupos amostrais: um grupo retrospectivo - composto por 98 amostras de DNA de pacientes diagnosticados com retinoblastoma pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) coletas entre 2011 a 2014 e 39 amostras de DNA provenientes do Hospital Santa Marcelina (HSM) / São Paulo, totalizando 137 amostras de DNA no grupo retrospectivo. O grupo prospectivo é composto por 11 amostras de DNA provenientes de pacientes com retinoblastoma atendidos no serviço de aconselhamento genético do Instituto Fernandes Figueira (IFF/ Fiocruz) coletadas entre 2015 a 2017 (Figura 16).

A partir do grupo retrospectivo que compõe a coorte, cinco amostras de DNA foram utilizadas para desenvolver a técnica de PCR quantitativa relativa, avaliando o número relativo de cópias do gene *RB1* e genes adjacentes a região cromossômica 13q14.2, para a detecção de grandes deleções ou inserções, com o objetivo de validar a técnica de MLPA realizada por Sena (2013). A técnica de *array*-CGH foi também utilizada para confirmar esses dados.

Abaixo temos o fluxograma das metodologias utilizadas no rastreamento de mutações no gene *RB1* em pacientes diagnosticados com retinoblastoma (Figura 16).

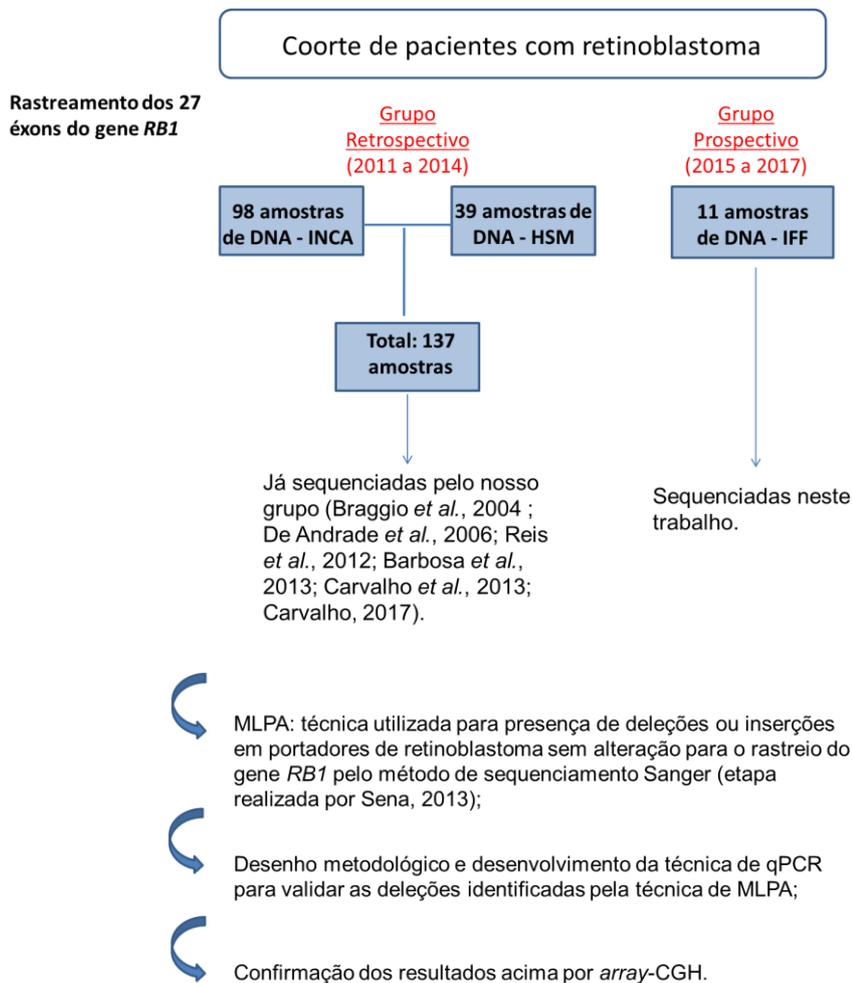


Figura 16: Fluxograma da metodologia utilizada para o rastreio de mutações no gene *RB1*.

Além do rastreio de mutações e deleções no gene *RB1*, realizamos a identificação e análise do polimorfismo rs2066827 no gene *CDKN1B*. Setenta e duas amostras, oriundas da coorte (72/148), foram inseridas no estudo. O menor número amostral para a análise polimórfica deve-se ao fato de haver algumas amostras com DNA degradado e outras sem material disponível para pesquisa. Também utilizamos 134 amostras de DNA de indivíduos não portadores de retinoblastoma, oriundos de um laboratório privado do Estado de Minas Gerais, de ambos os sexos, sem histórico de câncer, considerados grupo controle do nosso estudo para a análise comparativa do polimorfismo.

Para caracterizar o perfil clínico da coorte, dados dos pacientes foram coletados de seus prontuários médicos, e através de informações extraídas de questionário aplicado aos responsáveis dos pacientes do Hospital Santa

Marcelina/ SP. As informações coletadas foram: nome completo, data de nascimento, sexo, idade ao diagnóstico, principais sintomas ou sinais da doença, tempo de encaminhamento, lateralidade do tumor, histórico familiar de retinoblastoma ou outros tumores, estadiamento, localização tumoral e enucleação.

Este projeto foi apresentado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos e o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) foi obtido de todos os indivíduos ou de seus responsáveis legais incluídos neste estudo (Apêndices).

4.1.1 Estimativa da concentração e integridade do DNA

Para avaliar a integridade do DNA, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8% diluída em tampão TAE 1x (40 mM de Tris, 20 mM de ácido de acético, 1 mM de EDTA em pH 8.4) (Thermo Fisher®) e corado com brometo de etídio a 0,5 ug/mL, visualizado em um transiluminador de luz ultravioleta.

A quantidade de DNA foi estimada em espectrofotômetro NanoDrop2000 (Thermo Fisher®) nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm colocando-se 1 uL da amostra para a leitura. As amostras com alta concentração foram diluídas com água MilliQ para a concentração de uso de 100 ng/uL.

4.2 Rastreamento de mutações germinativas em *RB1*

O método de extração de DNA do sangue total foi do tipo *salting out* (Miller et al., 1988) a partir de sangue periférico dos pacientes com retinoblastoma coletados em dois tubos a vácuo com EDTA (8 mL).

O material genético de cada paciente foi quantificado através de NanoDrop2000 (Thermo Fisher®), utilizando 1uL da solução.

A verificação de mutações nos 27 éxons do gene *RB1* foi realizada a partir de oligonucleotídeos (ou iniciadores), condições de PCR (*Polymerase Chain Reaction*, reação em cadeia da polimerase) e sequenciamento são descritas por Barbosa et al. (2013). As sequências foram analisadas no *software* Sequencher™ demoversion 4.1.4 (Gene Codes Corporation 2005 – 775 Technology Drive, Ann Arbor, Michigan, USA) e comparadas com a sequência referência depositada no GenBank sob número de acesso NG_009009.1.

4.3 Predições *in silico* de variantes no gene *RB1*

Para avaliar o efeito das variantes identificadas no rastreamento do gene *RB1* foram realizadas predições *in silico* utilizando os seguintes programas: SIFT, PolyPhen-2 e TANGO *Aggregation Tendency* (Adzhubei et al., 2010; De Baets et al., 2012).

4.4 Modelagem molecular de mutações na proteína retinoblastoma

Três mutações germinativas no gene *RB1* de pacientes com retinoblastoma foram identificadas anteriormente por Carvalho (2017) (Tabela 2). Para avaliarmos os domínios alterados na estrutura da proteína retinoblastoma (pRB) nestes probandos utilizamos dos conhecimentos em modelagem molecular comparativa.

Para a geração dos modelos tridimensionais da pRB mutada, codificada pelo gene *RB1*, foi realizada uma busca por similaridade de sequências, usando o programa Blast (Altschul et al., 1990) contra o banco de dados Protein Data Bank - PDB (<https://www.rcsb.org/>), a fim de identificar o melhor molde para a realização de modelagem comparativa da proteína selvagem e as mutações identificadas.

Tabela 2: Mutações selecionadas para a realização de modelagem comparativa.

Posição genômica	Posição cDNA (éxon)	Posição da proteína
g.59695C>T	c.763c>T (éxon 8)	p.R255X
g.64101C>T	c.751C>T (éxon 8)	p.R251X
g.82576C>G	c.1574C>G (éxon 17)	p.525A>G

A sequência utilizada como entrada na busca por similaridade foi obtida do Uniprot (<http://www.uniprot.org/>), sob código de identificação P06400. Os modelos foram construídos utilizando o programa Modeller - versão 9.16 (Webb B & Sali, 2016) e o melhor modelo para cada proteína mutada foi escolhido com base no valor da pontuação DOPE.

Os modelos de proteína gerados usando modelagem comparativa frequentemente produzem comprimentos de ligação, ângulos de ligação, ângulos de torção e contatos desfavoráveis. Portanto, cada modelo foi

otimizado no próprio Modeller para regularizar a geometria local e relaxar contatos de ligações próximos.

Os modelos foram validados através dos programas ERRAT (<http://servicesn.mbi.ucla.edu/ERRAT/>) e PROCHECK (<http://servicesn.mbi.ucla.edu/PROCHECK/>).

Esta etapa do trabalho foi realizada em colaboração com a Dra. Ana Carolina Guimarães do Laboratório de Genômica Funcional e Bioinformática da Instituição Oswaldo Cruz / FIOCRUZ / Rio de Janeiro.

4.5 Revisão sistemática da literatura de casos com a síndrome da deleção 13q14 com retinoblastoma

A revisão foi realizada a partir de pesquisa em banco de dados (NCBI, acesso em 10/02/2017) utilizando as seguintes palavras-chave: "13q14 deletion syndrome", "*RB1* gene" e "retinoblastoma", onde nós inicialmente encontramos 31 estudos publicados que atendiam aos critérios pesquisados. No entanto, 21 trabalhos foram excluídos desta revisão devido a ausência de lateralidade para os casos de deleção, não verificação dos pontos de quebra nas deleções parciais e também os estudos de caso relato.

Finalmente, 11 estudos satisfizeram os critérios de busca e possuíam informações relevantes, como lateralidade, sexo e idade ao diagnóstico dos casos investigados que poderiam contribuir para nossos questionamentos. Aqueles que ainda não possuíam registro do sexo do paciente, mas possuía os demais critérios, foram mantidos.

4.6 PCR em Tempo Real

A PCR em tempo real ou PCR quantitativa (qPCR) é assim denominada por permitir a verificação da amplificação em tempo real. Esta amplificação é visualizada pela presença de compostos fluorescentes, monitorada por um detector de fluorescência, localizado no termociclador. A emissão dos compostos fluorescentes gera um sinal que aumenta na proporção direta da quantidade de produto da PCR (Applied Biosystems®; Ponchel et al., 2003).

O CT (*cycle threshold*) é o número de ciclos que uma reação leva para atingir uma determinada quantidade de fluorescência, denominada de linha de *threshold* (Figura 17- A) (Applied Biosystems®). Neste estudo, a linha de *threshold* foi posicionada automaticamente pelo equipamento na fase exponencial das reações de todos os experimentos. Após 30 – 35 ciclos, a intensidade do sinal de fluorescência geralmente começa a se estabilizar, indicando que a PCR atingiu a saturação, representada pela fase de platô (Figura 17- A) (Dorak, 2007).

O valor de CT depende do número de moléculas de DNA disponíveis para amplificação, o que significa que quanto maior for o número de moléculas inicial, menor será o número de ciclos (CT) necessários para que seja gerado proporcionalmente um valor exponencial do sinal de fluorescência (R_n) (superior à *baseline*) (Figura 17). Esse sinal de fluorescência gera as curvas de amplificação, conhecido como fase exponencial da reação de PCR, com CT específico (Figura 17- B).

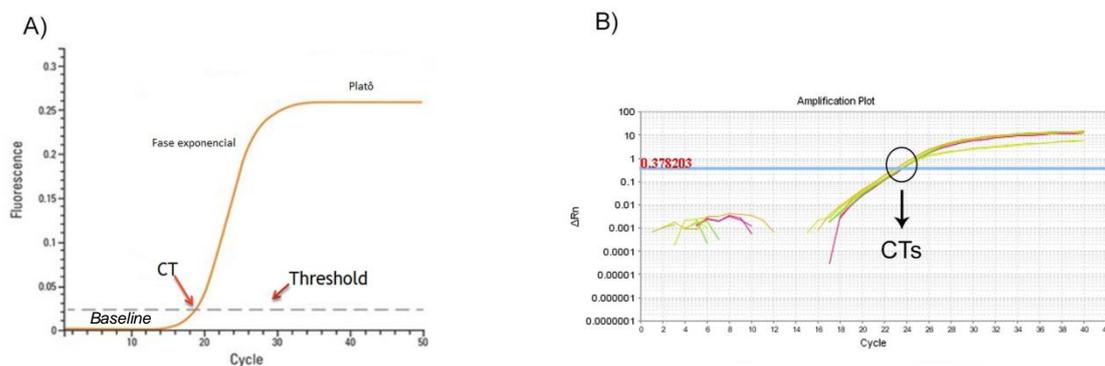


Figura 17: A) Esquema representativo das fases exponencial e platô da reação de qPCR. A fase de platô corresponde a PCR convencional. O CT (*cycle threshold*) localiza-se na intersecção entre a curva de amplificação da reação e a linha de *threshold*. B) Curvas de amplificação que na fase exponencial ultrapassa a linha de *threshold* (traço horizontal que representa o limiar de detecção da fluorescência) e o CT, necessário para cada alvo atingir determinado nível de fluorescência (R_n).

Fonte: Dados da autora, 2018.

A comparação das curvas de amplificação detectadas pelo equipamento é utilizada na quantificação relativa do número de cópias gênicas nas amostras de interesse. Essa comparação foi realizada através da adição de Sybr Green, um composto que se intercala na dupla fita de DNA e emite fluorescência, e os valores de CT foram utilizados (Ponchel et al., 2003).

Um gene com número de cópias conhecido e invariável (*house keeping gene*) é utilizado como controle interno em todas as reações. Desta forma, a diferença entre os CTs calculados para as amostras de interesse e o gene controle gera um valor, denominado de ΔCT , necessários para atingir o mesmo nível de fluorescência (R_n), podendo ser comparado com outras amostras de indivíduos diferentes (Dorak, 2007).

Após obter o ΔCT da amostra alvo e também do gene controle, é possível calcular o $\Delta\Delta CT$ utilizando-se a fórmula: $[\Delta CT_{amostra} - \Delta CT_{controle}]$. Este procedimento é conhecido como método $\Delta\Delta CT$ (Livak, 2001; Dorak, 2007).

Na fase exponencial da reação de PCR a concentração de DNA é duplicada a cada ciclo, formando uma função exponencial de base 2, cujo CT maior significa mais quantidade de produto amplificado em relação ao CT menor, visto que este precisou de ciclos a mais para ser detectado. Nesse sentido, o valor de $\Delta\Delta CT$ igual a 1 representa uma diferença de duas vezes o número de cópias gênicas de um indivíduo em relação a outro (Livak, 2001;

Campos Jr, 2009). Assim, a relação do número relativo de cópias de um determinado gene em um indivíduo em comparação ao número relativo de cópias deste mesmo gene, em outro indivíduo, pode ser calculada pela fórmula:

$$*NRC = 2^{(-\Delta\Delta CT)}$$

*número relativo de cópias.

4.6.1 Desenho dos oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos selecionados para o desenho e desenvolvimento da técnica de PCR quantitativa relativa para as amostras de retinoblastoma objetivaram detectar deleções no gene *RB1* (éxons 3, 10, 20 e 24) e genes adjacentes – *SUCLA2* e *MED4*, todos localizados na região cromossômica 13q14. A figura 18 ilustra a localização genômica dos genes avaliados nesta técnica. Os genes *ITM2B*, *RCBTB2* e *DLEU1* estão localizados na mesma região cromossômica e fazem parte das análises da técnica de MLPA.

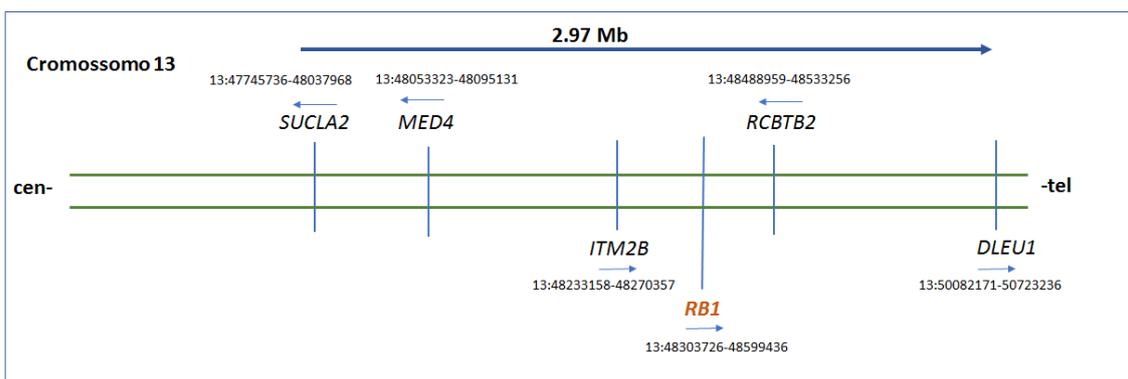


Figura 18: Desenho esquemático da localização genômica dos genes *SUCLA2*, *MED4* e *RB1*, localizados no cromossomo 13, avaliados na técnica de qPCR.
Fonte: Dados da autora, 2018.

Seis ferramentas disponíveis *online* foram utilizadas: o Primer3, para a construção dos iniciadores, seguindo critérios para a obtenção correta de oligonucleotídeos para PCR quantitativa (Dorak, 2007). A tabela abaixo mostra os critérios utilizados (Tabela 3). As ferramentas UCSC *In Silico*, OligoCalc, PCR *Start* e *BLAST* foram úteis na conferência e avaliação da especificidade dos segmentos obtidos.

Tabela 3: Critérios para desenho dos oligonucleotídeos para PCR em tempo real.

Tamanho do oligonucleotídeo entre 18 – 24 nucleotídeos;
Amplicon com tamanho menor que 250 pb;
Fitas <i>sense</i> e <i>antisense</i> com $T_m \leq 2^\circ\text{C}$ diferente para cada uma;
Oligonucleotídeos com T_m entre 50 – 60°C;
Oligonucleotídeo deve conter %GC em 50%, não menos que 35%, não mais que 65%;
Não deve haver grampo GC na ponta 3' (ou seja, GG, CC, CG ou GC);
Na extremidade 3' do oligonucleotídeo deve haver ≤ 2 GC nos últimos cinco nucleotídeos.

* T_m : temperatura de *Melting*

As regiões exônicas do gene *RB1* foram selecionadas, em princípio, através dos resultados obtidos pela técnica de MLPA que apontou casos de retinoblastoma com deleções parciais (intragênica) envolvendo a região promotora e éxons de 1 a 7, e deleções nos éxons 10 e 11, além de deleções completas no gene. Após realizar uma revisão sistemática de literatura dos casos de retinoblastoma com deleções parcial e/ou completa do gene *RB1*, identificamos que 61% de todos os casos relatados são de deleção completa. Desta forma, além dos éxons 3 e 10, selecionamos os éxons 20 e 24 que aparecem citados como pontos de quebra e contemplam regiões exônicas finais do gene *RB1*. O iniciador para o gene controle, referência (*ALB*) foi o mesmo utilizado por Meins et al. (2005). A Tabela 4 mostra as sequências dos oligonucleotídeos desenhadas e utilizadas neste experimento.

Tabela 4: Oligonucleotídeos desenhados para o ensaio de qPCR em pacientes com retinoblastoma e o gene controle *ALB*, obtido a partir de Meins et al. (2005).

Gene	<i>Forward</i> (5'- 3')	<i>Reverse</i> (5'- 3')	Tm (°C)
<i>SUCLA2</i>	GCCATCTAGGCACACAAACA	GCTGCGACAAAAGAAAGAAGA	52
<i>MED4</i>	AACTGGCAGTGGATGACTGA	CCTCCAACAGAAGCCAAGAG	54
<i>RB1E3</i>	GCAGCAGTTGACCTAGATGAGA	TTCGTTTCCTTTTATGGCAGA	59
<i>RB1E10</i>	TTGCATGCGAACTCAGTGTAT	CAGCACACAGAGGCACAGA	53.2
<i>RB1E20</i>	CACTTTGTGAACGCCTTCTG	GGTCCAAATGCCTGTCTCTC	59
<i>RB1E24</i>	TTCGGGGTGAGTATTTTCTTTC	GCCTGGATGAGGTGTTTGA	59
<i>ALB12</i>	AATGCTGCACAGAATCCTTGGT	TCATCGACTTCCAGAGCTGAAA	53

*Tm: temperatura de *Melting*

4.6.2 Teste de otimização da concentração dos oligonucleotídeos

Para o cálculo da dosagem gênica foi necessário aperfeiçoar alguns fatores, considerando o Sybr Green como meio de detecção. Como esse composto se intercala em dupla fita de DNA em um processo independente da sequência gênica, a sensibilidade deste método pode ser comprometida pela formação de dímeros de oligonucleotídeos e também pela inespecificidade da reação.

A formação de produtos inespecíficos na reação pode ser detectada através de uma curva de dissociação (curva de *Melting*), que mostra a dinâmica da dissociação do fluoróforo e das fitas de DNA através do aquecimento gradual da amostra. Assim, os produtos da PCR perdem o sinal da fluorescência causada pela desnaturação da dupla fita de DNA. Esta diminuição de sinal se concentra em uma determinada temperatura única, se a reação tiver produzido um único produto (Figura 19). Caso a desnaturação aconteça em temperaturas variadas, gerando 2 picos ou mais, significa que amplicons de diferentes sequências estão presentes naquele produto, gerando uma amplificação inespecífica.

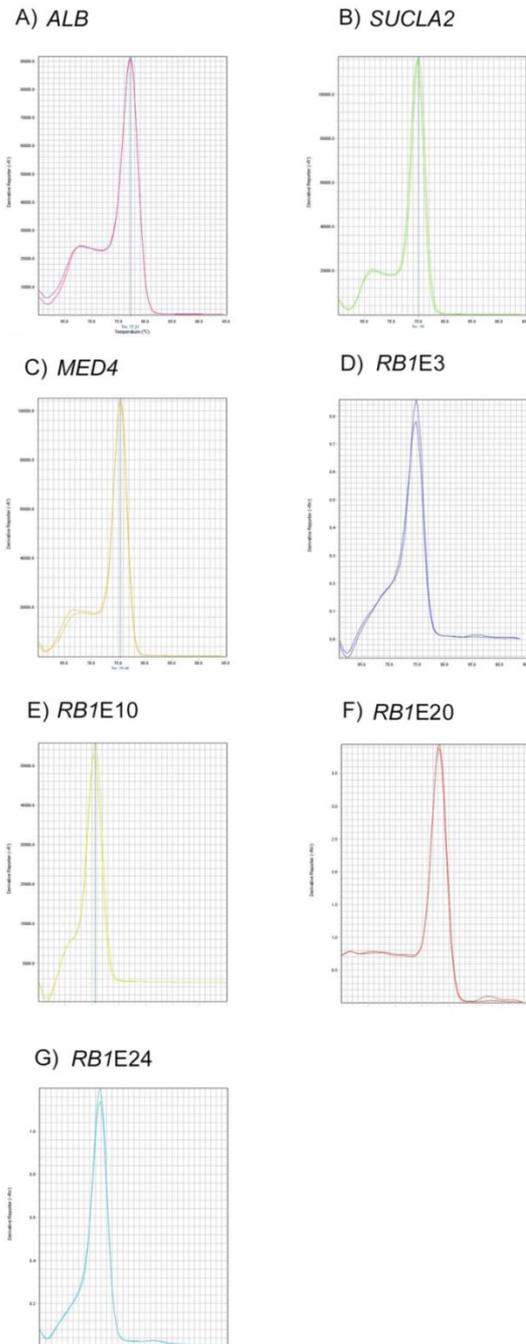


Figura 19: Curvas de dissociação (curvas de *Melting*) dos genes alvo e controle da reação de PCR em tempo real. A presença de um único pico demonstra a especificidade da reação.

Na dosagem do número de cópias dos genes *RB1*, *SUCLA2*, *MED4* utilizamos oligonucleotídeos específicos para cada gene alvo (Tabela 5) e, como controle interno, oligonucleotídeos para o gene *ALB* (albumina) localizado no cromossomo 4 (Meins et al., 2005; Ottaviani et al., 2015) detectados pelo termociclador StepOne Plus (Applied Biosystems®) e, em alguns experimentos, pelo termociclador 7500Fast (Applied Biosystems®).

As concentrações ótimas dos oligonucleotídeos para o ensaio de PCR em tempo real são as que apresentaram a melhor performance reacional, isto é, com menor valor de CT, e com ausência de amplificação inespecífica. As concentrações testadas foram de 50, 100, 300 e 500 η molar em reações com amostra de DNA controle, isto é, indivíduo não portador de retinoblastoma, em placas de 96 poços com volume final de 25 μ L com todas as amostras em triplicatas. A figura abaixo (Figura 20) mostra a performance das reações para o gene referência (*ALB*) com concentração ótima em 300 η molar. As concentrações ótimas dos demais genes são apresentadas na tabela 17.

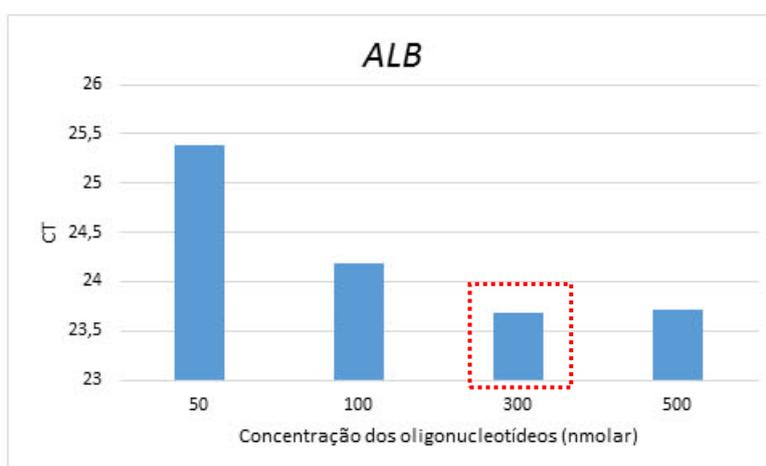


Figura 20: Gráfico CT *versus* Concentração dos oligonucleotídeos do gene referência (*ALB*). Os dados demonstram a performance das reações nas diferentes concentrações (50, 100, 300 e 500 η molar) e os respectivos CTs atingidos na reação. Em destaque, a concentração ótima utilizada nos ensaios para este gene.

Tabela 5: Concentrações ótimas dos genes alvo para os ensaios, obtidas do teste de concentrações de oligonucleotídeos.

Genes	Concentração ótima (η molar)
<i>SUCLA2</i>	300
<i>MED4</i>	100
<i>RB1E3</i>	300
<i>RB1E10</i>	100
<i>RB1E20</i>	300
<i>RB1E24</i>	300

4.6.3 Teste de diluição de DNA

Com o objetivo de aperfeiçoar a quantificação, verificamos a eficiência das reações de PCR e se a mesma é influenciada pela concentração inicial de DNA utilizado. Os pares de oligonucleotídeos foram testados em reações contendo concentrações variadas de DNA, diluídas em 1, 2, 4, 10, 100 e 1000 vezes da amostra de DNA controle. A curva de diluição foi baseada na comparação dos dados obtidos do gene de referência (*ALB*) e das amostras de DNA com concentração desconhecida.

Os resultados analisados serão apresentados em um gráfico do log do fator de diluição *versus* o CT de cada concentração.

A eficiência das reações foi realizada a partir de cada par de oligonucleotídeos em reações contendo concentrações variadas de DNA, diluídas em 1, 2, 4, 10, 100 e 1000 vezes da amostra de DNA controle.

A curva de diluição foi baseada na comparação dos dados obtidos do gene de referência (*ALB*) e das amostras de DNA com concentração desconhecida. Com a Figura 21 observamos um crescimento linear dos CTs em relação ao fator Log das diluições e um paralelismo entre os dois padrões. Estes resultados demonstram que a reação manteve a sua eficiência em variadas concentrações de DNA.

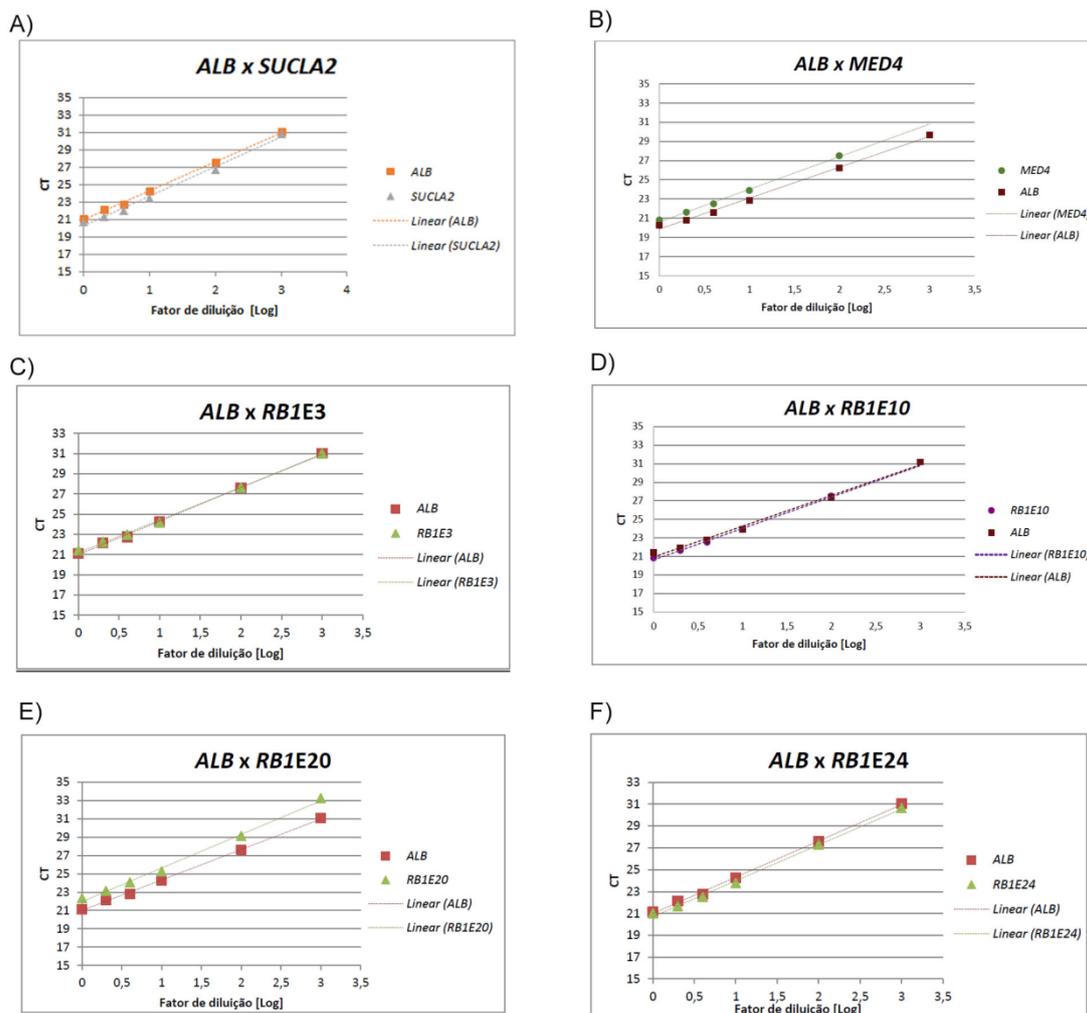


Figura 21: Gráficos do teste de diluição de DNA. As diferentes diluições (1, 2, 4, 10, 100 e 1000) representadas pelo Fator Log de diluição vs o CT de cada oligonucleotídeo alvo comparado ao gene de referência *ALB*. Observa-se um crescimento linear dos CTs em relação ao Log das diluições. O paralelismo de ambas as retas demonstra que a reação mantém a sua eficiência em variadas concentrações de DNA.

Juntamente com o gráfico, obtivemos a equação da reta ($y = ax + b$) mais o valor de R^2 e calculamos a eficiência de cada reação através da fórmula:

$$E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$$

Slope: inclinação da reta referente à curva padrão (valor de 'a' na equação da reta).

A eficiência (E) é a medida que corresponde à taxa de amplificação da PCR, permitindo determinar o sucesso da técnica (Dorak, 2007). O ângulo da reta (*slope*) indica a eficiência da amplificação para o teste; um valor próximo

de 3,32 representa uma eficiência de 100% (Dorak, 2007). Geralmente, uma eficiência entre 90% - 110% é considerada aceitável e um $R^2 > 0,99$ fornece boas concentrações na correlação de dois valores (Applied Biosystems®). A tabela abaixo apresenta as eficiências obtidas para cada gene testado (Tabela 6).

Tabela 6: Eficiências obtidas para cada gene nas reações de concentração de DNA aplicando-se a fórmula (E) a partir da equação da reta de cada reação.

Genes	R²	Inclinação (<i>slope</i>)	Eficiências
<i>ALB</i>	0,998	3,31	100%
<i>SUCLA2</i>	0,992	3,40	96%
<i>MED4</i>	0,999	3,21	100%
<i>RB1E3</i>	0,997	3,22	100%
<i>RB1E10</i>	0,993	3,31	100%
<i>RB1E20</i>	0,994	3,40	94%
<i>RB1E24</i>	0,997	3,28	100%

Após estabelecer as concentrações ideais de cada oligonucleotídeo e a curva de diluição de DNA ter sido confirmada, a validação das amostras de retinoblastoma com deleções parcial ou completa dos genes *SUCLA2*, *MED4* e *RB1* foram realizadas.

4.6.4 Ensaio de dosagem do número de cópias gênicas

Nove amostras de DNA obtido de pacientes diagnosticados com retinoblastoma, que pertencem ao grupo retrospectivo de nossa coorte, apresentaram deleções parciais do gene *RB1* ou completa para *RB1* e genes adjacentes (*SUCLA 2* e *MED4*), localizados no cromossomo 13, detectados pela técnica de MLPA (Sena, 2013). No entanto, devido a falta de material genético disponível, apenas 5 amostras foram utilizadas nesse ensaio (Tabela 7).

Tabela 7: Probandos da coorte (148) de retinoblastoma com mutação germinativa identificados com deleção parcial do gene *RB1* ou completa dos genes *RB1*, *SUCLA2* e *MED4* pela técnica de MLPA (Sena, 2013).

Amostras	Encaminhamento
probando 1	INCA/ RJ
probando 3	HSM/ SP
probando 5	INCA/ RJ
probando 8	HSM/ SP
probando 9	HSM/ SP

Todas as amostras estudadas foram comparadas com o mesmo indivíduo controle. Assim, todos os valores de $\Delta\Delta CT$ foram transformados em valores de número relativo de cópias, sendo o intervalo entre 0,4 – 0,6 referente a uma cópia gênica e o intervalo entre 0,8 – 1,0 referente a 2 cópias gênicas. Um intervalo entre 1,2 – 1,6 representa uma aneuploidia. Em nosso estudo utilizamos uma amostra de DNA proveniente de um paciente com trissomia do cromossomo 21 (Síndrome de Patau) para demonstrar o ganho cromossômico, detectado pela dosagem do número de cópias gênicas.

As reações foram feitas em triplicata utilizando o kit Sybr Green PCR Master Mix (Thermo Fisher®). Para uma reação de volume final de 25 ul foram adicionados 12,5 ul de Master Mix 2X, 0,25 uL [100 nmolar] e 0,75 uL [300 nmolar] de oligonucleotídeos (dependendo da concentração cada gene alvo),

6 uL de DNA (contendo aproximadamente 50 ng) e água MilliQ para completar o volume final. As reações foram executadas no equipamento de PCR em tempo real StepOne Plus ou 7500Fast (Applied Biosystems®) sendo submetidas à ciclagem padrão do equipamento (95°C por 10 minutos e 40 ciclos com desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento a 60°C por 1 minuto, extensão a 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto e 95°C por 15 minutos).

Os resultados serão apresentados em gráfico de barras, demonstrando o número relativo de cópias gênicas para cada gene alvo, em cada probando.

4.7 Array-CGH

O *array*-CGH é uma técnica capaz de identificar alterações no número de cópias. Esta técnica baseia-se numa comparação entre o genoma da amostra do indivíduo afetado com uma amostra controle, permitindo identificar alterações de tamanho reduzido (50 a 100 kb) que são difíceis de ser identificados por citogenética convencional (Colombo e Rahal, 2010).

As etapas dessa técnica são ilustradas na figura abaixo (Figura 22).

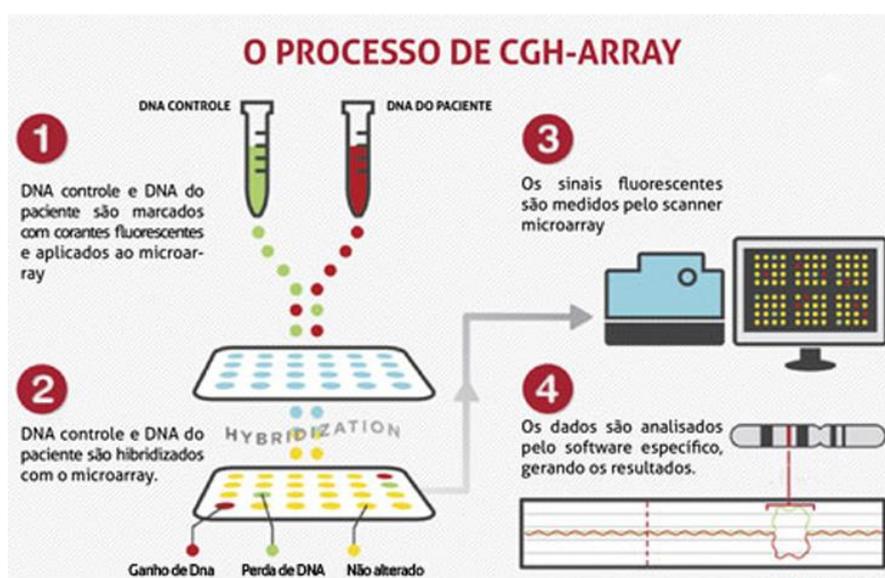


Figura 22: Etapas da técnica de *array*-CGH.
Fonte: www.hermespardini.com.br, 13/06/2018.

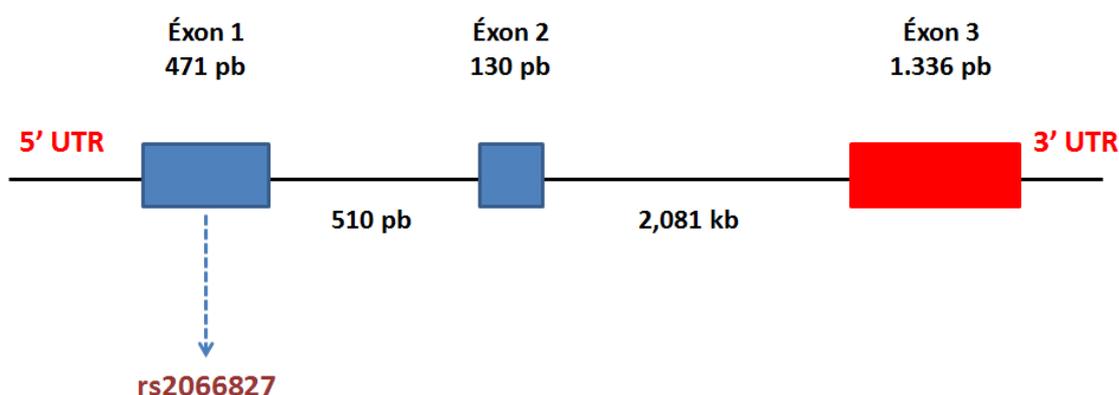
Os mesmos probandos avaliados no ensaio de dosagem gênica por PCR em tempo real, com deleção heterozigótica parcial ou completa do gene *RB1*, foram avaliados também pela técnica de *array*-CGH.

As análises para deleção em regiões heterozigóticas foi realizada por hibridização de 200 ng de DNA genômico de portadores de retinoblastoma para Illumina Infinium Omni2.5 Exome-8 v1.2 (2.5 M probes) BeadChip, de acordo com recomendações do fabricante (Illumina®).

Essa etapa foi realizada em colaboração com o Dr. Julian Nevado do INGEMM, Hospital La Paz, Universidade de Madrid, Madrid, Espanha.

4.8 Análise do polimorfismo rs2066827 no gene *CDKN1B*

Para identificar e avaliar o polimorfismo rs2066827 no gene *CDKN1B*, localizado no éxon 1, utilizamos oligonucleotídeos descritos por Pasquali et al. (2011). A figura abaixo (Figura 23) demonstra as características genômicas do gene investigado.



Éxons codificantes: 2
Tamanho do transcrito: 2.657 pb
Proteína traduzida – p27: 198 aminoácidos
Tamanho DNA: 4.99 kb

Figura 23: Esquema do gene *CDKN1B*, localizado na região cromossômica 12p13, com seus codificadores, tamanhos e localização do polimorfismo avaliado neste estudo.
Fonte: Dados da autora, 2018.

A padronização da técnica de PCR foi feita através da PCR *touchdown* conforme descrito na tabela 8 segundo Khalid et al. (2015). Para cada reação de amplificação em um volume total de 25 μ L foram utilizados: 2,0 μ M de cada dNTP, 10 pmol de cada iniciador, 1,5 mM de $MgCl_2$, 1x do tampão de PCR, 1 U de Taq DNA polimerase Gold (Invitrogen®) e DNA genômico (100 ng).

As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio, e quando devidamente amplificadas foram purificadas com o kit Exo-SAP-IT (Thermo Fisher®) de acordo com instruções do fabricante.

As reações de sequenciamento Sanger foram feitas utilizando-se o BigDye™ Terminator v1.1 Sequencing Kit (Thermo Fisher®). Em cada reação

de 10 uL foram utilizados 100 ng de produto purificado, 1,5 µL do kit BigDye e 10 pmol dos iniciadores (*senso* e *antisenso*). A ciclagem utilizada foi de 30 ciclos compostos por desnaturação a 95°C por 20 segundos, anelamento a 50°C por 15 segundos e extensão a 60°C por 1 minuto. Em seguida, foi feita a precipitação das amostras. O sequenciamento foi realizado com o uso do sequenciador automático 3730xl DNA *Analyzer*. A análise das sequências foi feita utilizando-se o programa Sequencher™ demoversion 4.1.4 (Gene Codes Corporation 2005 –775 Technology Drive, Ann Arbor, Michigan, USA) e comparado com a sequência referência NC.12.12.

Tabela 8: Ciclagem para amplificação do gene *CDKN1B* – p27, éxon 1.

Passos	Temperatura	Tempo
1	95° C	12 min
2	94° C *	1 min
	60° C (redução da temperatura em -0,5° C a cada ciclo) *	
3		1 min
4	72° C *	1 min
5	94° C **	1 min
6	55° C **	1 min
7	72° C **	1 min
8	72° C	10 min

* Repetir os passos em 10 ciclos; ** Repetir os passos em 25 ciclos.

Os cálculos de frequências alélicas entre a coorte de pacientes com retinoblastoma e grupo controle, bem como a observação do equilíbrio de Hardy-Weinberg para ambos os grupos serão realizados pelo teste qui-quadrado admitindo-se um valor de p significativo quando menor que 0,05 (p < 0,05).

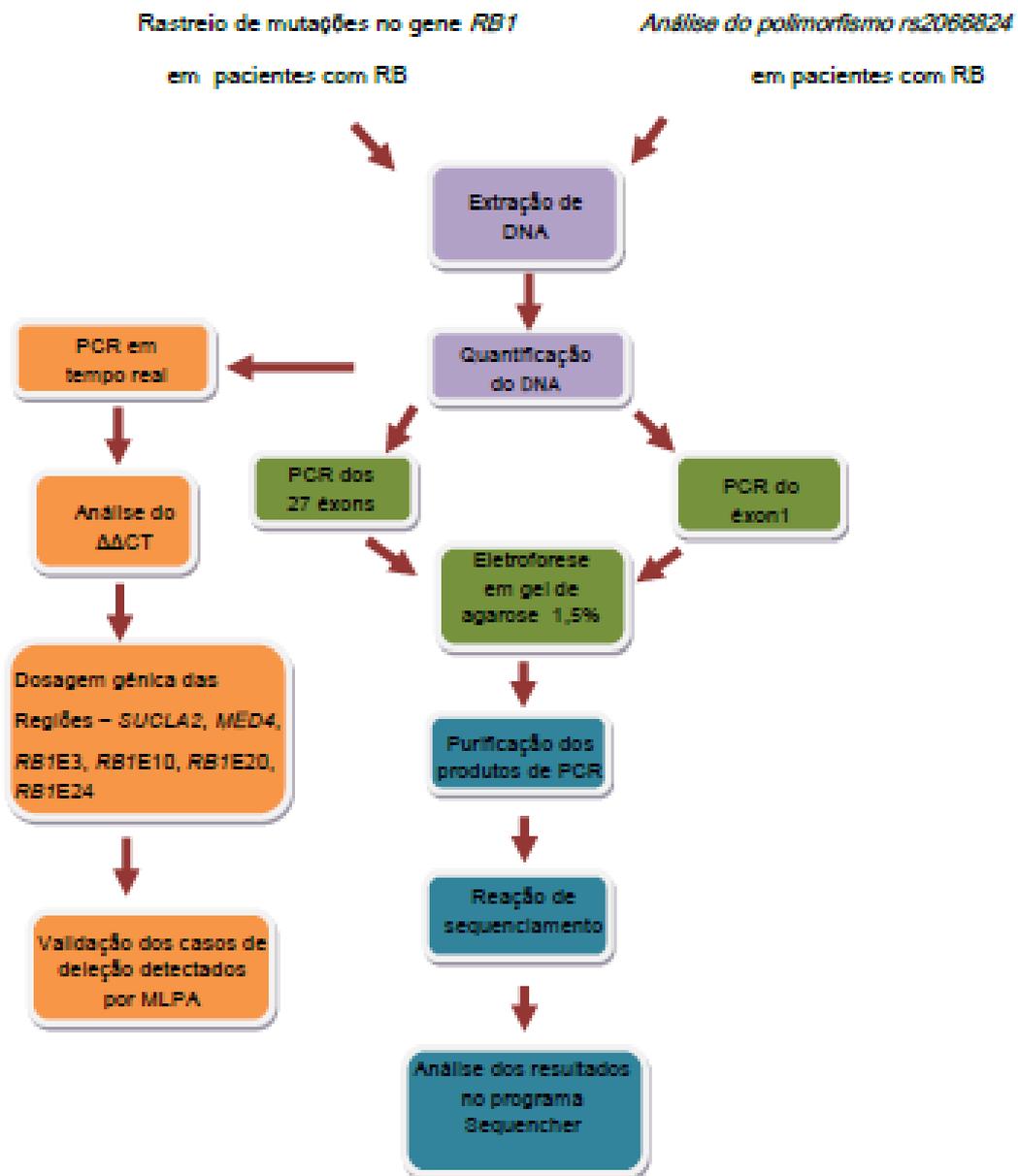


Figura 24: Esquema representativo das técnicas utilizadas neste estudo.

5. Resultados

5.1 Características clínicas de pacientes com retinoblastoma

Os dados clínicos dos 148 pacientes com retinoblastoma que compõem nossa coorte foram obtidos de prontuários médicos no momento da coleta de sangue periférico do paciente (Tabela 9).

Nossa coorte não demonstrou associação entre sexo e desenvolvimento do retinoblastoma. Quarenta por cento (40%) dos pacientes apresentaram a doença bilateral, 58% unilateral e 2% da nossa coorte apresentou o retinoblastoma trilateral. O histórico familiar da doença foi observado em apenas 10% dos casos e o sintoma mais comumente relatado foi a leucocoria (73%), seguida do estrabismo (12%). Outros sintomas observados em 6% da coorte foram hiperemia, febre intermitente, secreção, dor, lacrimejamento, pupila dilatada e perda da visão.

A média de aparecimento dos primeiros sintomas foi 17 meses, sendo que nos casos bilaterais a média de idade para o aparecimento dos primeiros sintomas foi de 9 meses e 22 meses para os casos unilaterais, conforme previsto pela teoria de Knudson (1971). Oitenta e três por cento (83%) dos pacientes que tiveram o olho afetado pelo tumor foram enucleados. A opção de tratamento é feita de acordo com o estadiamento (Ali et al., 2018).

Neste trabalho, tumores dos grupos IV/V e D/E (sistemas de classificação R-E e internacional) foram considerados avançados (De Potter, 2002) em 32% dos pacientes e a manifestação extraocular identificada na coorte baseou-se no protocolo de estadiamento CCSG (Cancer Childhood Study Group) envolvendo pacientes que se inserem nos grupos II, III e IV. Dessa coorte, 6% dos probandos foram a óbito.

Tabela 9: Características clínicas da coorte de 148 pacientes com retinoblastoma.

Características	N (%)
Sexo	Feminino 72 (49%) Masculino 76 (51%)
Histórico familiar de retinoblastoma	Presente 15 (10%) Ausente 133 (90%)
Lateralidade	Unilateral 86 (58%) Bilateral 59 (40%) Trilateral 3 (2%)
Manifestação extraocular	Presente 40 (27%) Ausente 108 (73%)
Sinais/ Sintomas	Leucocoria 108 (73%) Estrabismo 18 (12%) Leucocoria e estrabismo 3 (2%) Outros 9 (6%) Não informado 13 (9%)
Média do aparecimento dos sintomas	17.0 (meses) \pm 3.0
Média do tempo de encaminhamento	6.3 (meses) \pm 1.7
Enucleação	Sim 123 (83%) Não 25 (17%)
Estádio tumoral	Avançado 48 (32%) Não avançado 35 (24%) Desconhecido 65 (44%)
Status	Vivo 139 (94%) Óbito 9 (6%)

5.2 Rastreamento do gene *RB1* em pacientes com retinoblastoma

Dentre os 148 pacientes, 137 tiveram o rastreamento do gene *RB1* realizado em trabalhos anteriores (Braggio et al., 2004; De Andrade et al., 2006; Reis et al., 2012; Barbosa et al., 2013; Carvalho et al., 2013; Carvalho, 2017) e 11 tiveram seu *status* avaliado nesse estudo – grupo prospectivo. A Tabela 10 sumariza as variantes encontradas em cada probando.

Tabela 10: Variantes encontradas nos 11 probandos que compõem o grupo prospectivo rastreados neste estudo.

Probando	Idade ao diagnóstico (meses)	Lateralidade	Variantes identificadas
1	15	U	rs2252544; rs2854351; rs198617; rs185587; rs2070752.
2	48	U	rs2252544; rs2854351; rs198617; rs185587; rs2070752; rs198580; rs3020646.
3	12	B	rs2252544; rs2854351; rs198617; rs185587; rs198580; rs3020646; c.1216-28C/T (IVS12).
4	19	B	rs2854351; rs520342; rs198617; rs3020646; rs3092904; c.380+145T/A (IVS3); c.1216-28C/T (IVS12); c.1814+72T>A (IVS 18).
5	28	B	rs2854351; rs520342; rs198617; rs198580; rs3020646; rs3092883; c.1216-28 C/T (IVS12); c.1814+72T>A (IVS 18).
6	36	U	rs520342; rs198617; rs191504668; rs2070752; rs145544222; rs3020646; c.380+145 T/A (IVS3).
7	32	U	c.848G>T (éxon 8); rs2252544; rs2854351; rs198617; rs549786289; rs3020646.
8	36	U	rs2252544; rs2854351; rs520342; rs3092904; rs198580; rs3020646; c.1389+134 A/T (IVS14-15).
9	51	U	rs3020646; rs2854351; rs198617; rs2252544; rs198580; rs520342; rs2070752.
10	36	U	rs198617; rs3092883; rs191504668; rs147342515; rs198580;; rs3020646; c.1389+143C/T (IVS14-15); c.1814+72T>A (IVS 18).
11	10	B	cm942038 (éxon 17); rs2854351; rs198617; rs185587; rs3020646; c.380+145 T/A (IVS3).

Ao todo identificamos 20 variantes no rastreamento do gene *RB1*. Duas delas estão localizadas em regiões exônicas, sendo que uma é tida como não descrita (c.848G>T) (Tabela 11). Entre as 18 variantes intrônicas, encontramos 5 novas variantes, não depositadas em bancos de dados e não observadas na literatura científica (Tabela 12).

Tabela 11: Variantes encontradas em éxons do gene *RB1* de 11 amostras de pacientes com retinoblastoma (grupo prospectivo).

dbSNP	Posição genômica	posição cDNA	Posição na proteína	éxon	Nº de casos	MAF Gobal*			ClinVar	Ref. (LOVD)
						ExAC	1000G	Ensem		
-	g. 48362944	c.848 G>T	C283F	8	1	-	-	-	-	-
CM942038**	g.48955473	c.1589 A>G	K530R	17	1	-	-	-	-	Cowell et al., 1994

NC_000013.11

*Acesso em 24/09/2018.

**Human Gene Mutation Database (HGMD).

Tabela 12: Variantes intrônicas encontradas no rastreamento do gene *RB1* do grupo prospectivo.

dbSNP	posição genômica	posição cDNA	Íntron (IVS)	Nº de casos	MAF Global**				ClinVar	Ref. (LOVD)
					ExAC	ExAC-L	1000G	Ensem		
rs2854351	g.48304135	c.137+86 T>C	1	9	-	-	T=0,009	T=0,009	-	-
rs2252544	g.48304156	c.137+107 G>A	1	6	-	-	G=0,49	G=0,49	-	Dommering et al., 2014; Mol et al., 2015; Oliveira et al., 2016
rs520342	g.48342759	c.380+45 C>T	3	5	T=0,24	T=0,21	T=0,20	T=0,20	Ben	Blanquet et al., 1995; Mateu et al., 1997; Sivakumuran et al., 2005; Barbosa et al., 2013
rs198617	g.48345222	c.500+23 T>G	4	10	T=0,04	T=0,05	T=0,09	T=0,09	Ben	Mateu et al., 1997; Sivakumuran et al., 2005; Barbosa et al., 2013
rs3092883	g.48367661	c.1049+58 G>A	10	2	-	-	A=0,03	A=0,03	-	Sivakumuran et al., 2005; Kalsoon et al., 2015
rs185587	g.48373333	c.1128-72 G>T	11	4	-	-	G=0,08	G=0,08	-	Sivakumuran et al., 2005; Varley e Mitra, 2008; Kalsoon et al., 2015
rs191504668	g.48379754	c.1389+104 C>T	14-15	2	-	-	T=0,002	T=0	-	-
rs2070752	g.48379885	c.1390-168 G>C	14-15	4	-	-	G=0,27	G=0,27	-	Barbosa et al., 2013

rs147342515	g. 48380118	c.1421+34 C>T	15-16	1	-	-	-	-	-	-	-
rs145544222	g. 48381465	c.1695+22 G>A	17	1	-	-	-	-	-	-	-
rs198580	g.48459611	c.1961-77 G>A	19	6	-	-	G=0,13	G=0,13	-	-	Sivakumuran et al., 2005; Barbosa et al., 2013
rs3092904	g.48477345	c.2664-10 T>A	25	2	A=0,26	A=0,22	A=0,19	A= 0,19	Ben	-	Sivakumuran et al., 2005; Barbosa et al., 2013
rs3020646	g.48476876	c.2663+33 C>T	25	10	C=0,04	C=0,05	C=0,11	C=0,11	Ben	-	Sivakumuran et al., 2005; Varley e Mitra, 2008; Barbosa et al., 2013
Variante não descritas											
-	g.48342859	c.380+145 T>A	3-4	3	-	-	-	-	-	-	-
-	g.48376890	c.1216-28 C>T	12	3	-	-	-	-	-	-	-
-	g.48379784	c.1389+134 A>T	14-15	1	-	-	-	-	-	-	-
-	g.48379793	c.1389+143 C>T	14-15	1	-	-	-	-	-	-	-
-	g.48453183	c.1814+72 T>A	18	3	-	-	-	-	-	-	-

NC_000013.11

**Acesso em 24/09/2018.

As variantes localizadas nos éxons 8 e 17 do gene *RB1*, g.48362944 e g.48955473 (CM942038), respectivamente, podem ser observadas nos eletroferogramas abaixo (Figuras 25 e 26).

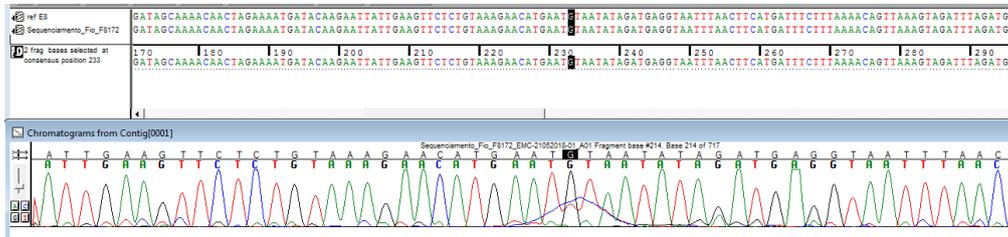


Figura 25: Eletroferograma mostrando a posição genômica g. 48362944, em negrito, com uma heterozigose G/T no éxon 8 do gene *RB1*. NC_000013.11

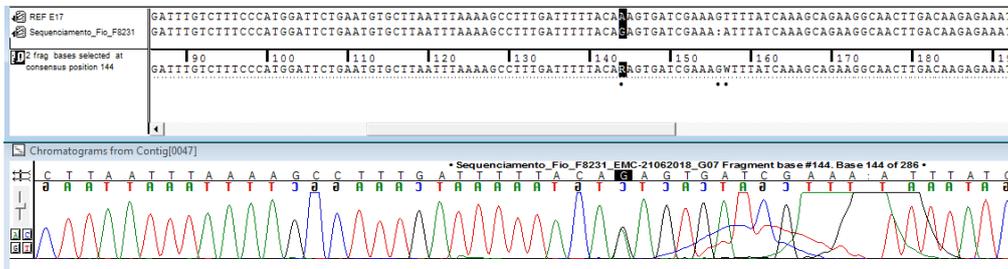
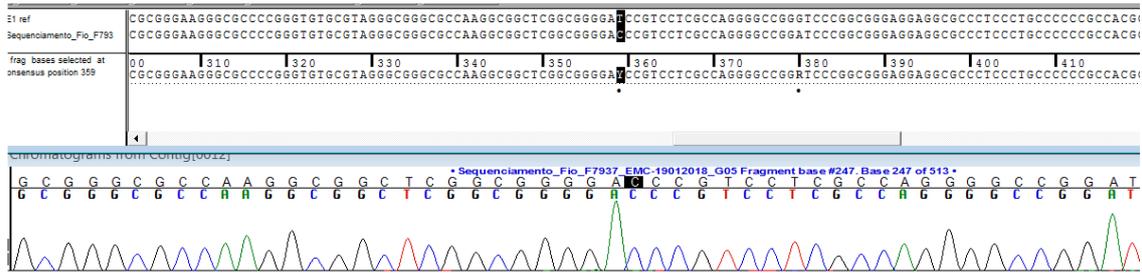


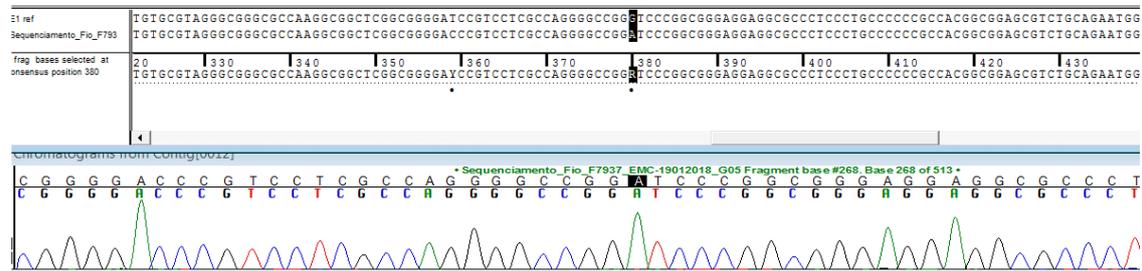
Figura 26: Eletroferograma mostrando a posição genômica g. 48955473, em negrito, com uma heterozigose A/G no éxon 17 do gene *RB1*. NC_000013.11

Os eletroferogramas das variantes intrônicas encontram-se na Figura 27.

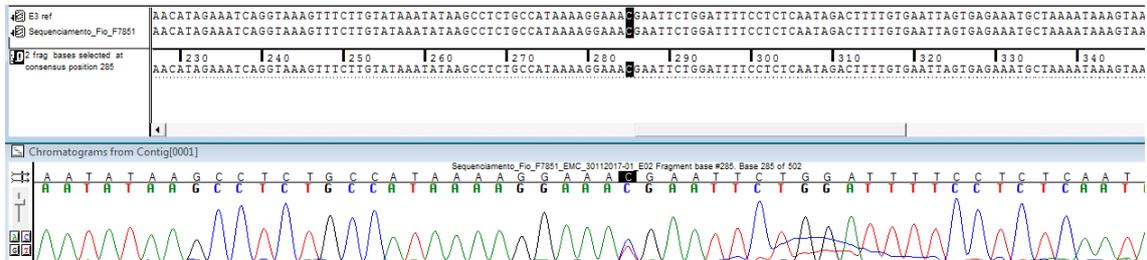
rs2854351 g.48304135 c.137+86T>C (IVS1): homozigose T>C



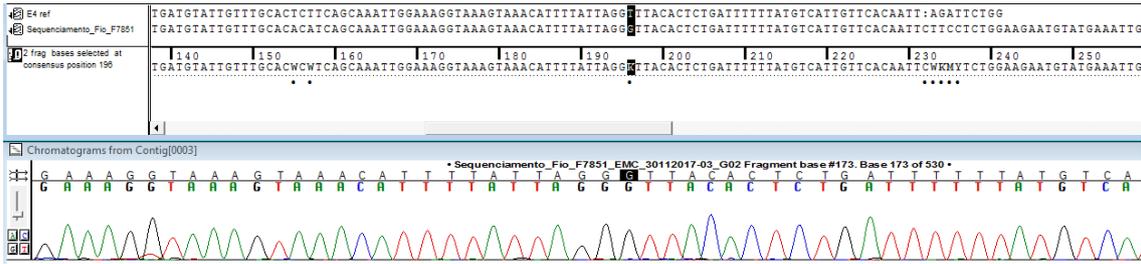
rs2252544 g.48304156 c.137+107G>A (IVS1): homozigose G>A



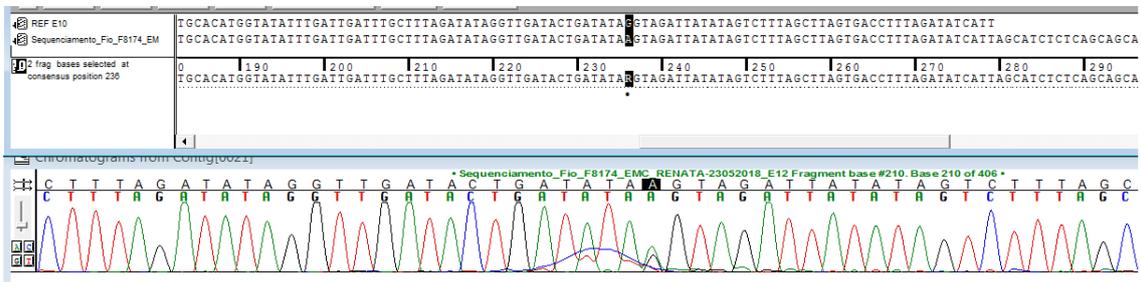
rs520342 g.48342759 c.380+45C>T (IVS3): heterozigose C/T



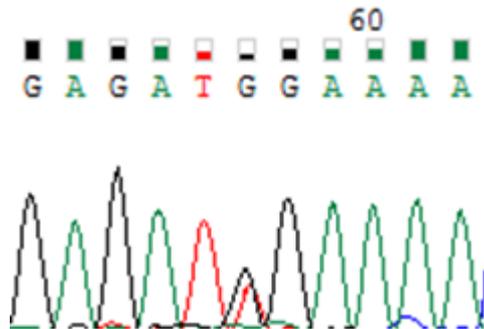
rs198617 g.48345222 c.500+23T>G (IVS4): homozigose T>G



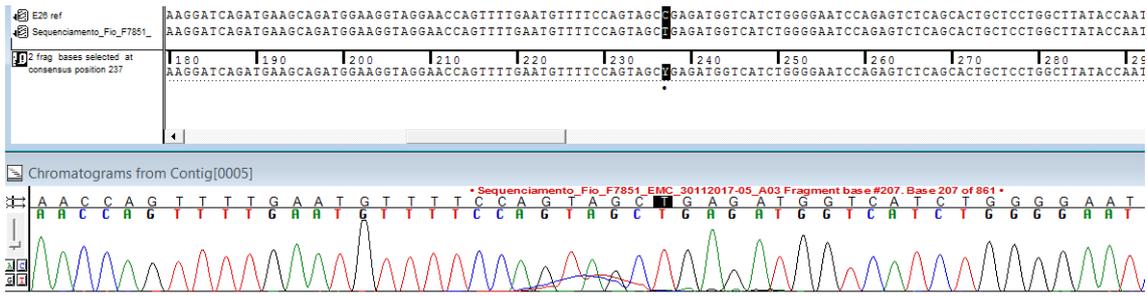
rs3092883 g.48367661 c.1049+58 (IVS 10) G>A :heterozigoto G/A



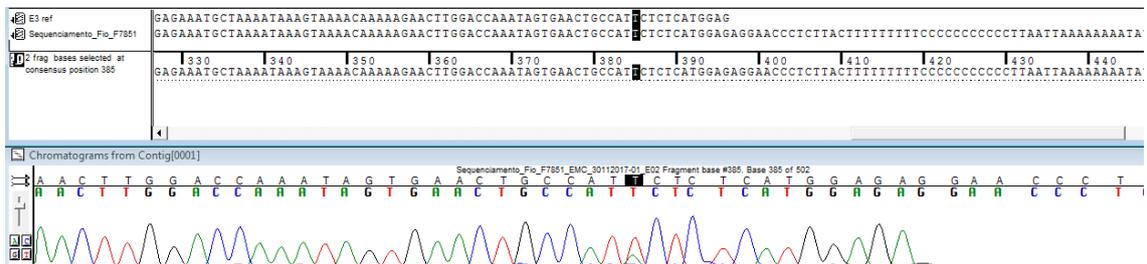
rs185587 g.48373333 c.1128-72G>T (IVS11): heterozigose G/T



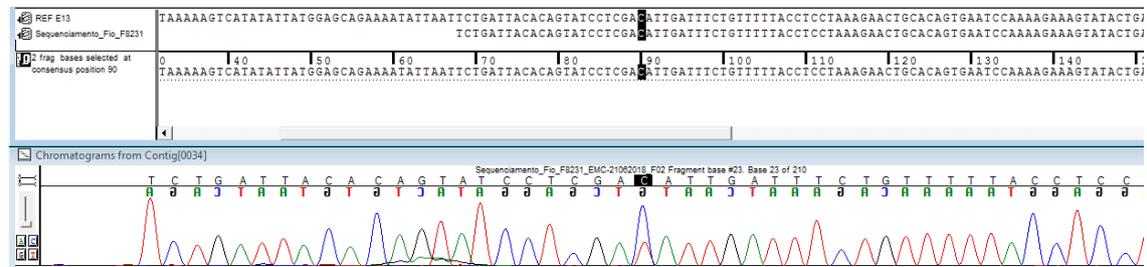
rs3020646 g.48476876 c.2663+33 C>T (IVS25): homozigose C>T



g.48342859 c.380+145 T/A (IVS3)* NÃO DESCRITA : heterozigose T/A



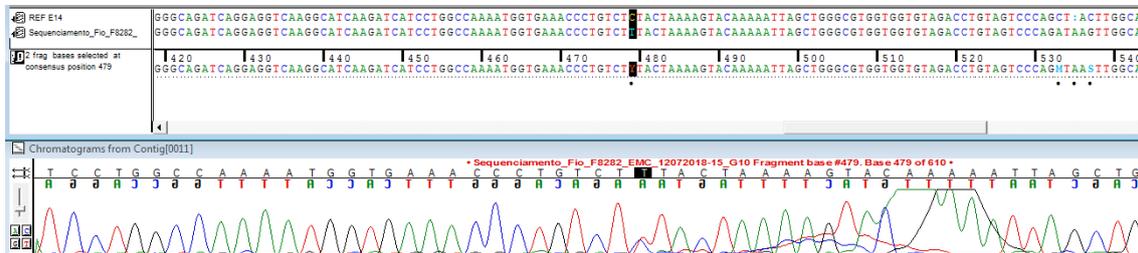
g.48376890 c.1216-28 (IVS 12)* NÃO DESCRITA : heterozigoto C/T



g.48379784 c.1389+134 (IVS 14-15)* NÃO DESCRITA :heterozigoto A/T



g.48379793 c.1389+143 (IVS 14-15)* NÃO DESCRITA :heterozigose C/T



g.48453183 c.1814+72 T>A (IVS 18)* NÃO DESCRITA : heterozigose T/A

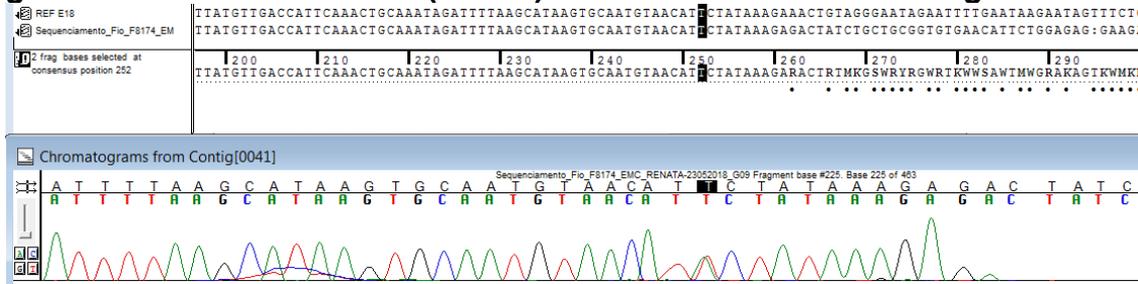


Figura 27: Eletroferogramas das variantes intrônicas encontradas no rastreamento do gene *RB1* no grupo prospectivo.NC_000013.11.

5.3 Predições *in silico* de variantes do gene *RB1*:

Diante de duas variantes exônicas identificadas no rastreamento dos 11 probandos de pacientes com retinoblastoma, utilizamos ferramentas de análise *in silico* para prever os possíveis efeitos das variantes na proteína (pRB) (Tabela 13). A predição da primeira variante, tida como nova, nos mostra um efeito deletério na proteína; o mesmo é observado na variante g.48955473 (CM942038) que confirma os achados da literatura.

As variantes não descritas de regiões intrônicas do *RB1* não apresentaram efeito nos preditores utilizados (dados não mostrados).

Tabela 13: Variantes exônicas encontradas no grupo prospectivo (N=11) de pacientes com retinoblastoma.

Preditores <i>in silico</i>				
Posição genômica	TANGO Aggregation Tendency	SIFT	PolyPhen-2	Consequência
g.48362944	-	Efeito deletério	Efeito deletério	substituição
g.48955473	Reduz a atividade da proteína	Efeito deletério	Efeito deletério	substituição

5.4 Modelagens moleculares de mutações na proteína RB:

Três mutações germinativas, identificadas por Carvalho (2017), foram utilizadas para realizar modelagens moleculares comparativas, com o objetivo de demonstrar como tais alterações modificam a estrutura dos domínios da proteína retinoblastoma e conseqüentemente a sua função.

A Tabela 14 mostra as mutações germinativas encontradas por Carvalho (2017) no gene *RB1* utilizadas para a modelagem molecular comparativa.

Tabela 4: Mutações germinativas selecionadas para modelagem molecular.

Caso	Lateralidade	Posição genômica	Posição do transcrito (éxon)	Posição da Proteína	Referência
24	bilateral	g.59695C>T	c.763C>T (éxon 8)	p.R255X	Blanquet et al., 1994
28	bilateral	g.64101C>T	c.751C>T (éxon 8)	p.R251X	Cowell et al., 1994
38	unilateral	g.82576C>G	c.1574C>G (éxon 17)	p. A525G	Richter et al., 2003

Os moldes selecionados e utilizados para a construção dos modelos por modelagem comparativa, são resultado da busca por similaridade no banco de

dados do PDB, com estruturas tridimensionais depositadas sob códigos 4elj e 4ell.

O primeiro resultado (4elj) representa a cadeia A da estrutura do cristal da pRB inativa, de *Homo sapiens* expressa em um sistema de *Escherichia coli*, tendo 95% de identidade e 73% de cobertura com a proteína de interesse. O segundo molde selecionado (4ell) representa a estrutura do domínio *pocket* da pRB inativa de *Homo sapiens*, também expressa em um sistema de *Escherichia coli*, com 99% de identidade e 44% de cobertura com a proteína alvo. Ambas as estruturas foram obtidas por difração de raio-X, sendo a resolução de cada uma 2.7 Å e 1.98 Å. O alinhamento entre as sequências da proteína alvo (P06400) e seus respectivos moldes (4elj e 4ell) é mostrado na figura 28.

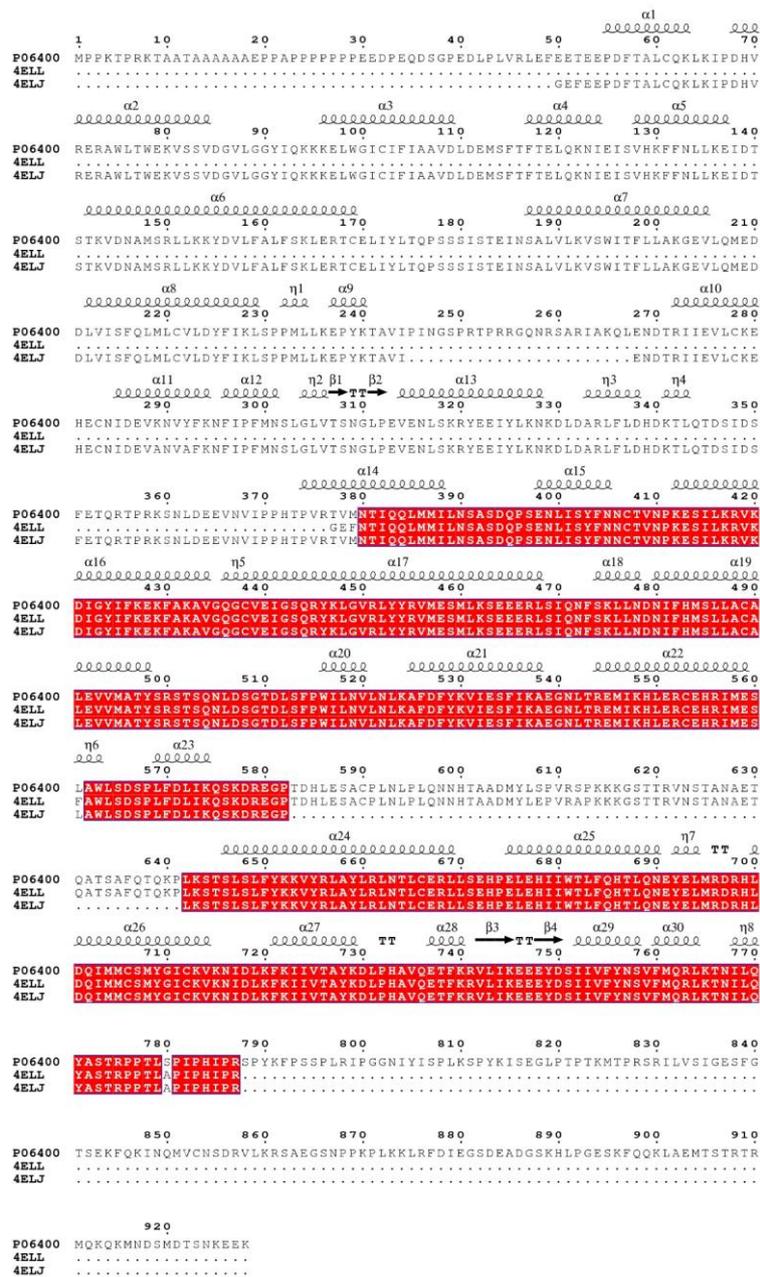


Figura 28: Alinhamento múltiplo contendo a sequência alvo (P06400) e as sequências moldes (4elj e 4ell) utilizadas para a modelagem comparativa. O alinhamento foi realizado com o programa clustal ômega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) e visualizado no ESPript (<http://esript.ibcp.fr/ESPript/ESPript/index.php>). Hélices são representadas por α e π , Voltas são representadas pela letra T.

Foram retiradas parte da região N-terminal (resíduos 1 a 52) e a região C-terminal (resíduos 787 a 928) para as modelagens. Estas regiões foram retiradas, pois não tiveram suas estruturas determinadas em nenhum dos moldes escolhidos e, portanto, não poderiam ser resolvidas por modelagem comparativa. A Figura 29 representa os domínios da pRB com os resíduos de aminoácidos. Cada domínio está representado por cores que serão visualizados na modelagem dos modelos.

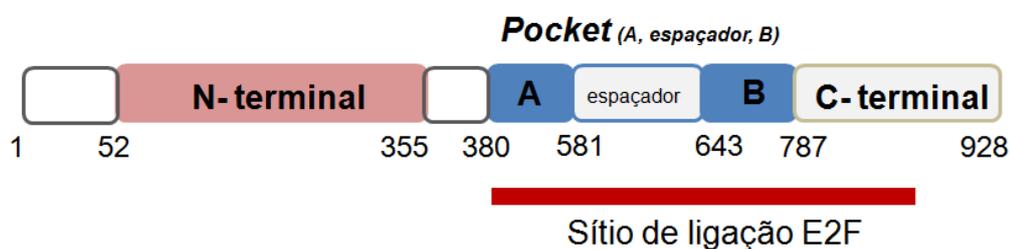


Figura 29: Domínios da proteína retinoblastoma. A modelagem estrutural comparativa ocorreu apenas nos domínios N-terminal e *Pocket*, uma vez que não foram encontrados moldes de similaridade para a proteína completa.

Fonte: Adaptado de Burke et al., 2012.

Foram gerados 50 modelos por modelagem comparativa com o programa Modeller (versão 9.16) para cada proteína mutada. O melhor modelo para cada proteína mutada foi escolhido com base no valor da pontuação DOPE (dados não mostrados).

Tanto os modelos gerados quanto os moldes utilizados foram avaliados pelo ERRAT e PROCHECK (geração dos gráficos de Ramachandran plot). A avaliação do ERRAT analisa as estatísticas de interações não relacionadas entre diferentes tipos de átomos através de uma comparação com estatísticas de estruturas altamente refinadas, podendo assim, diferenciar regiões

incorretas. Este método leva em consideração que diferentes tipos de átomos são distribuídos não aleatoriamente em relação aos outros e erros na construção de modelos levam a distribuições mais aleatórias dos diferentes tipos de átomos, que podem ser distinguidos de distribuições corretas por métodos estatísticos. Os resultados obtidos para os dois programas mostram que os modelos gerados têm boa qualidade e são confiáveis. Estes resultados estão resumidos na tabela 15.

Tabela 5: Resultados de avaliação dos modelos e dos moldes utilizando os programas ERRAT e PROCHECK.

MODELOS/MOLDES	ERRAT	PROCHECK (Gráfico de Ramachandran)	
		Aminoácidos em regiões favoráveis	Aminoácidos em regiões permitidas
4ell	100	93,0%	6,7%
4elj	100	90,9%	8,7%
Modelo c.751C>T-p.R251X	93,6	95,1%	3,3%
Modelo c.763C>T-p.R255X	83,8	95,7%	3,2%
Modelo c.1574C>G-p.A525G	79,6	91,8%	6,7%

Os dados expostos na tabela acima são verificados nos gráficos de Ramachandran plot gerados pelo programa PROCHECK para cada modelo abaixo.

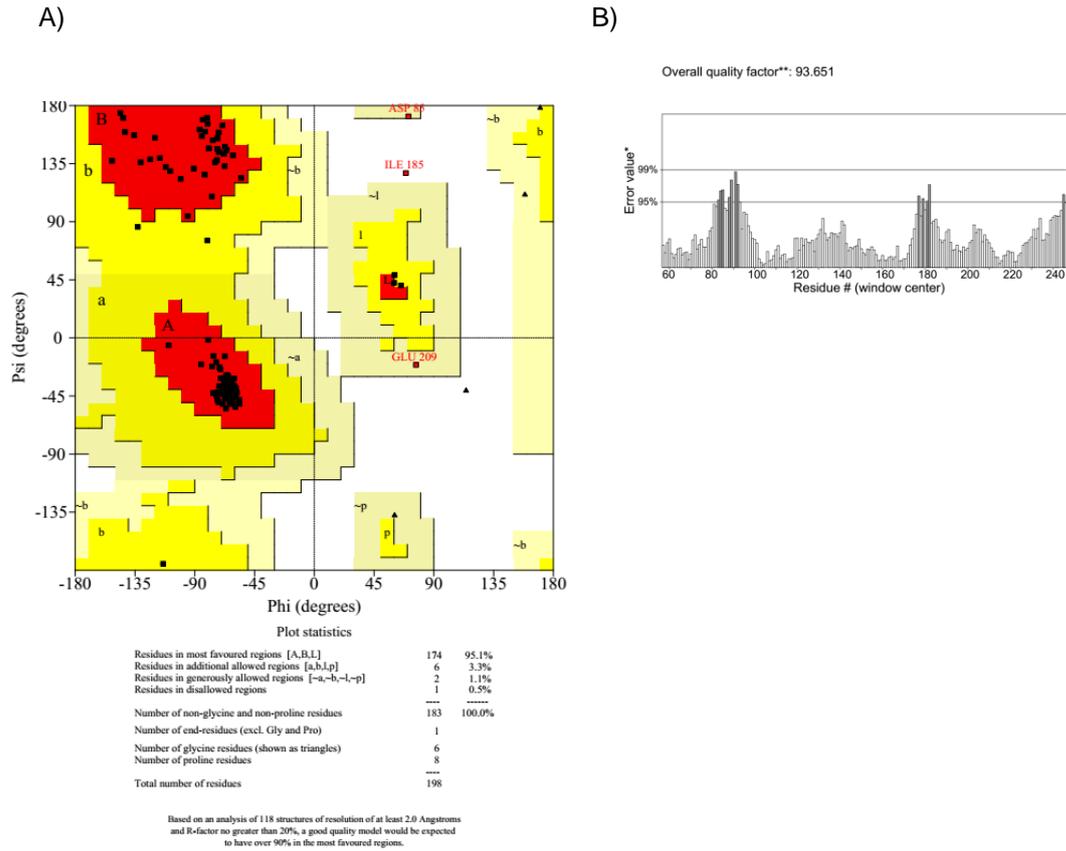
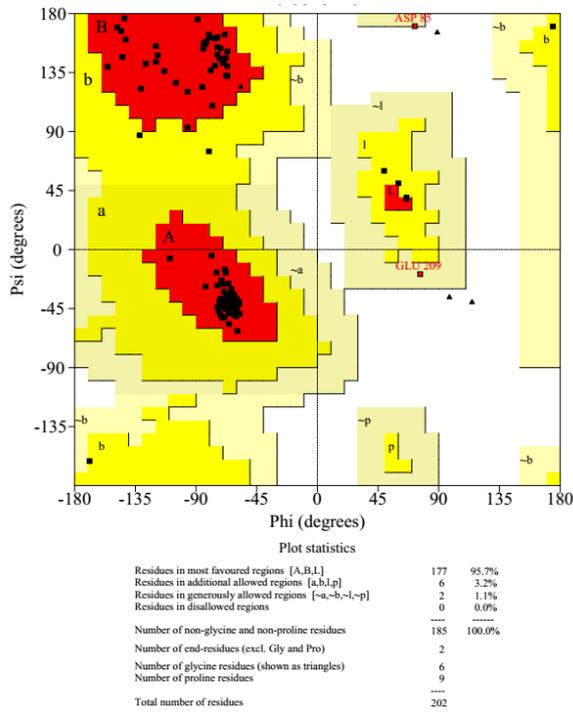


Figura 30: Resultado das análises de Ramachandran plot (A) que define 4 regiões no diagrama de Ramachandran: região permitida (indicada em vermelho), região adicionalmente permitida (indicada em amarelo), região generosamente permitida (indicada em amarelo claro) e região proibida (indicada em branco) e ERRAT (B) do modelo gerado para a mutação c.751C>T – p.R251X. No eixo de erro (Error value), duas linhas são desenhadas para indicar a confiança com a qual é possível rejeitar regiões que estejam fora do valor de restrição.

C)



D)

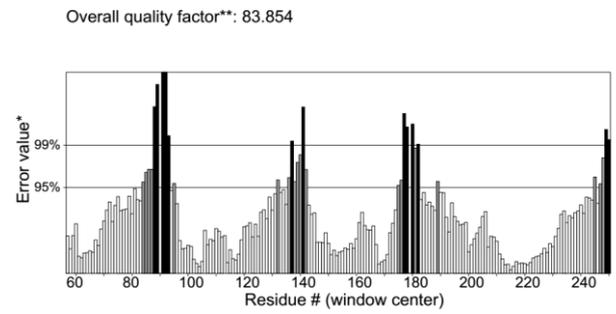


Figura 31: Resultado das análises de Ramachandran plot (A) e ERRAT (B) do modelo gerado para a mutação c.763C>T - p.R255X.

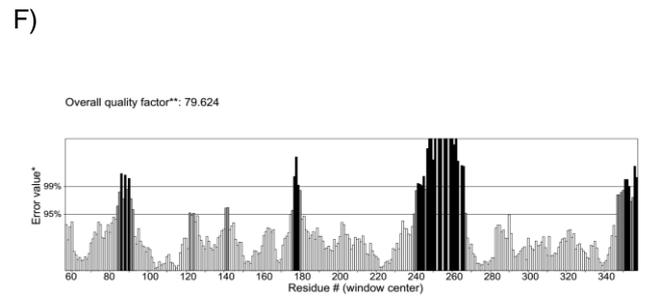
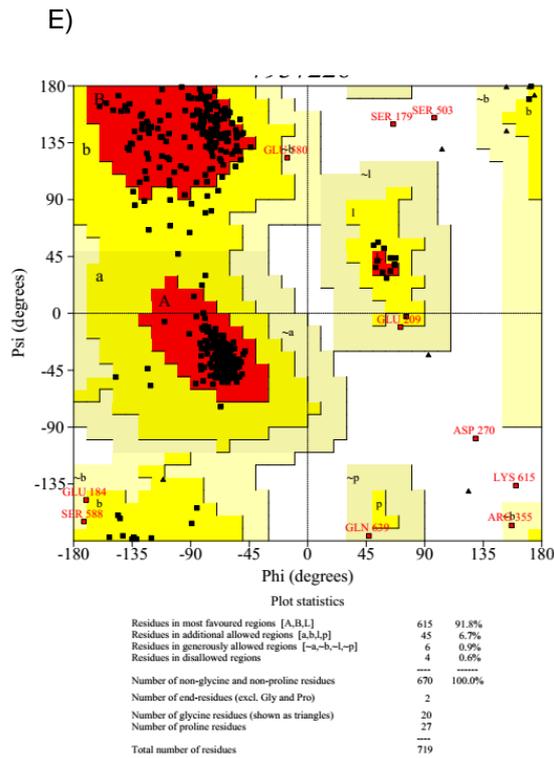


Figura 32: Resultado das análises de Ramachandran plot (A) e ERRAT (B) do modelo gerado para a mutação c.1574C>G – p.A525G.

Os modelos obtidos para cada mutação são expostos a seguir. O primeiro modelo consiste em uma mutação *stop* códon que gera uma proteína truncada. Em verde temos a estrutura da proteína mutada (c.751C>T – p.R251X) e os domínios N-terminal e *pocket* da proteína não mutada são representados pelas cores rosa e azul, respectivamente (Figura 33). É possível observar que grande parte da proteína é perdida, o que está relacionado com a perda de função, uma vez que a região do domínio *pocket* é perdida.

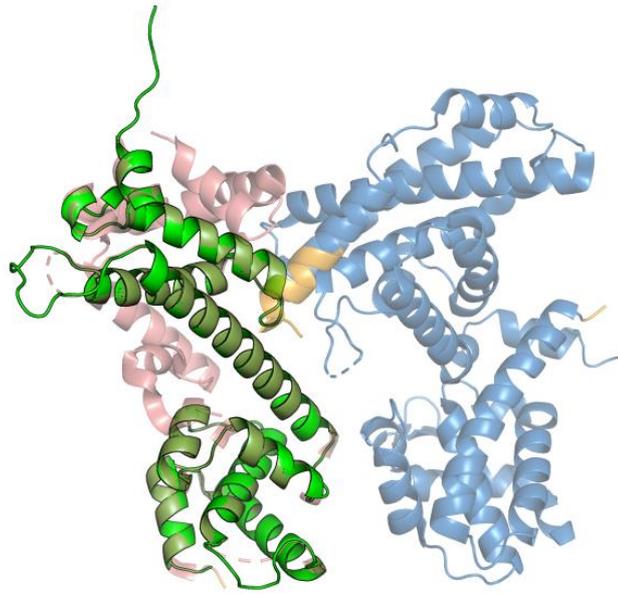


Figura 33: Alinhamento estrutural do modelo gerado para a mutação c.751C>T – p.R251X (verde) com a proteína selvagem (rosa - azul). Grande parte da proteína foi perdida, o que está relacionado com a perda de função, uma vez que a região do domínio *pocket* é perdida.

No modelo representativo da mutação c.763C>T - p.R255X (Figura 34) também é possível observar que o *stop* códon prematuro leva a uma diminuição considerável no tamanho da proteína, excluindo regiões de extrema importância para a função da mesma.

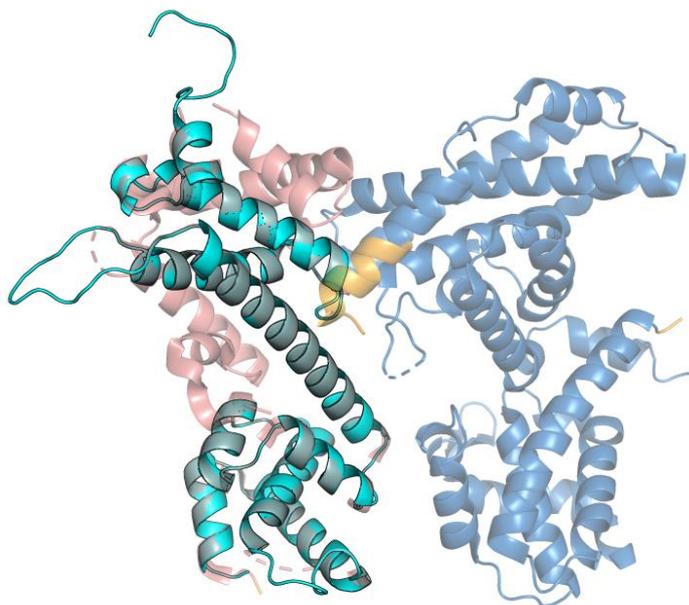


Figura 34: Alinhamento estrutural do modelo gerado para a mutação c.763C>T - p.R255X (azul turquesa) com a proteína não mutada (rosa - azul). Grande parte da proteína foi perdida, o que está relacionado com a perda de função, uma vez que a região do domínio *pocket* é perdida.

O modelo da mutação pontual c.1574C>G - p.A525G é exposto na Figura 35. Em destaque, os aminoácidos alterados (Alalina para Glicina). A diferença entre eles é de um grupamento CH_2 , o que torna a mutação não perceptível no modelo molecular.

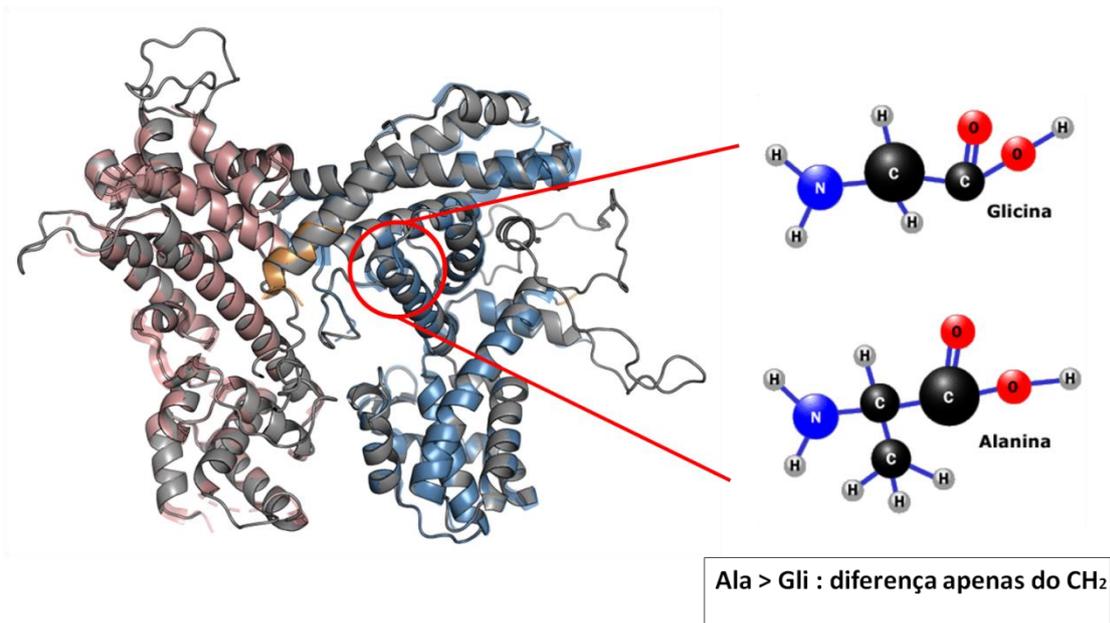


Figura 35: Alinhamento estrutural do modelo gerado para a mutação c.1574C>G - p.A525G (cinza) com a proteína não mutada (rosa - azul). Em destaque, os aminoácidos alterados (Alanina para Glicina). A diferença entre eles é de um grupamento CH₂, o que torna a mutação não perceptível no modelo molecular.

5.5 Revisão sistemática da literatura de casos da síndrome 13q14 com retinoblastoma

A revisão sistemática da literatura foi motivada com base em quatro questionamentos levantados durante o desenvolvimento do estudo:

(1) Qual a proporção de casos com deleções completas e parciais do gene *RB1* ?

(2) Há maior frequência de bilateralidade em portadores de deleção do gene *RB1* quando pelo menos um dos pontos de quebra está dentro do gene?

(3) Dentre os casos com deleção completa do gene *RB1* há maior frequência de bilateralidade em portadores de deleção com tamanho maior que 1 Mb ?

(4) Há maior frequência de bilateralidade quando portadores de deleção do *RB1* também têm deleção dos genes *SUCLA2* e/ou *MED4* ?

A revisão dos 11 trabalhos publicados entre 2003 e 2018 que atenderam aos critérios de busca nos bancos de dados (NCBI) nos permitiu observar casos de deleção envolvendo o gene *RB1*, com deleção completa ou parcial do gene, sexo, lateralidade e idade ao diagnóstico de cada probando. Esses dados estão sumarizados na tabela 16.

Tabela 6: Trabalhos publicados com ênfase na deleção 13q14 em pacientes com retinoblastoma. O total de deleções identificadas e aquelas que correspondem à deleção completa e parcial do gene *RB1* foram observados. Na tabela encontram-se também os casos referentes a este trabalho.

País	N Total	Deleção <i>RB1</i>			Sexo		Lateralidade do tumor			Ref.
		N (%)	completa	parcial	M	F	U	B	T	
Argentina	144	8 (5%)	6	2	NI	NI	4	6	-	Ottaviani et al., 2013
Brasil	64	9 (14%)	5	4	4	5	2	7	-	Este trabalho, 2018
China	85	8 (9%)	5	3	3	5	-	8	-	He et al., 2014
França	192	18 (9%)	6	12	NI	NI	1	17	-	Houdayer et al., 2014
Índia	50	5 (10%)	1	4	NI	NI	1	4	-	Singh et al., 2016
	33	4 (12%)	1	3	0	4	0	4	-	Devarajan et al., 2015
Itália	65	10 (17%)	6	4	6	4	5	4	1	Grotta et al., 2015
Malásia	19	3 (16%)	2	1	0	3	1	2	-	Khalid et al, 2015
Países Baixos	529	12 (2%)	12	-	7	5	5	7	-	Dommering et al., 2014
EUA	30	4 (13%)	3	1	NI	NI	-	4	-	Li et al., 2016
	358	25 (7%)	16	9	NI	NI	5	20	-	Richter et al., 2003

Vietnã	34	6 (18%)	5	1	2	4	-	6	-	Nguyen et al., 2018
Total	1.603	112 (7%)	68 (61%)	44 (39%)	22	30	24	87	1	

A partir de 1.603 casos de pacientes diagnosticados com retinoblastoma nas referências citadas, 112 casos são de deleções envolvendo o gene *RB1* e demais genes da região 13q14, uma proporção de 7% para tais casos. Este dado fortalece nossos achados referenciais que prevêm cerca de 5% - 10% de casos com deleção na região 13q14 em pacientes com retinoblastoma. Sessenta e oito (61%) correspondem a deleções completas do gene *RB1* e 44 casos (39%) são de deleções parciais com os pontos de quebras definidos. Observamos também haver mais casos do sexo feminino, mas sem diferença estatisticamente significativa para ambos os grupos ($\chi^2= 2,83$, $p=0,09$).

Em relação à segunda pergunta, o maior número de casos registrados é da forma bilateral da doença para a presença de deleções completas e parciais. O teste do qui-quadrado (χ^2) apresenta valor de $\chi^2= 15,80$, $p= 0,000071$ apresentando diferença significativa entre as formas unilaterais e bilaterais da doença nos casos de deleção (Tabela 17).

Tabela 7: Teste do qui-quadrado (χ^2) aplicado aos casos de deleções completas e parciais de pacientes com retinoblastoma identificados na literatura quanto à lateralidade da doença.

	Unilateral	Bilateral	Total
Deleção completa	23	45	68
Deleção parcial	1	43	44
Total	24	88*	112 (Total Geral)

*O caso trilateral foi inserido no grupo de bilaterais.

Ainda foi possível verificarmos os pontos de quebra relatados em cada caso apresentado nos estudos. A tabela abaixo (Tabela 18) mostra os casos de deleções parciais do gene *RB1* encontrados na revisão sistemática da literatura e seus pontos de quebra.

Tabela 8: Pontos de quebra de deleções envolvendo o gene *RB1* em pacientes com retinoblastoma encontrados na literatura.

Referência	Casos	Sexo		Lateralidade			Deleção Parcial
		M	F	U	B	T	
Devarajan et al., 2015	1		+		+		E4-6
	2		+		+		E24-25
	3		+		+		E10-12
Grotta et al., 2015	1		+		+		E1
	2		+		+		E17
	3	+			+		E3-6
	4		+		+		E7
He et al., 2014	1				+		E13-16
	2				+		E7-17
	3				+		E7-9
Houdayer et al., 2014	1				+		P-E6
	2				+		P-E2
	3				+		P-E2
	4				+		E2
	5				+		E2
	6				+		E3

	7				+		E8
	8				+		E18-27
	9				+		E19-20
	10				+		E24-27
	11				+		P-E17
	12				+		P-E17
Khalid et al., 2015	1		+		+		P-E3
Li et al., 2016	1				+		P-E17
Nguyen et al., 2018	1		+		+		E4-27
Ottaviani et al., 2013	1				+		E1-17
	2				+		E18-27
Richter et al., 2003	1				+		E18-27
	2				+		P-E2
	3				+		P-E2
	4				+		E17
	5				+		E17
	6				+		E17
	7				+		P-E17
	8				+		E13
	9				+		E13
Singh et al., 2016	1		+	+			E8-11
	2	NI			+		E24-27
	3	+			+		E25
	4		+		+		E25-27
Nosso estudo, 2018	1		+		+		E10-11
	2	+			+		E18-27

	3	+			+		E1-7
	4		+		+		P-E1
Total	44	4	12	1	43	0	-

A partir da observação dos pontos de quebra identificados nesses estudos, é possível concluir que os éxons 2, 17 e 27 são mais envolvidos em quebras nos casos de deleções parciais do gene *RB1*.

Em nossa coorte, os probandos com deleção completa, variando de 12 a 15.4 Mb, além de serem bilaterais possuem deleção também dos genes *SUCLA2* e *MED4*. Não foi possível encontrar uma relação para os questionamentos sobre a lateralidade e deleções maiores que 1 Mb e para os casos envolvendo os genes *SUCLA2* e *MED4*, uma vez que apenas Mitter et al. (2011) e Matilainen et al. (2015) relacionaram retinoblastoma e deleções envolvendo estes genes.

Todos os dados encontrados nas referências bibliográficas da revisão podem ser apreciados nos Apêndices deste trabalho.

5.6 Dosagem do número de cópias gênicas dos genes *SUCLA2*, *MED4* e *RB1*

Dos cinco probandos com retinoblastoma avaliados, foram identificados 2 pacientes com deleções intragênicas envolvendo o gene *RB1*, na região cromossômica 13q14, e 3 pacientes com deleção completa envolvendo os genes dessa mesma região cromossômica – *SUCLA2*, *MED4* e *RB1* (éxons 3, 10, 20 e 24). Os resultados da PCR em tempo real destes probandos foram comparados com os resultados de um indivíduo não portador de retinoblastoma (controle), com dosagem gênica referente a duas cópias dos genes avaliados neste estudo, e também uma amostra de um indivíduo com trissomia do cromossomo 13 – síndrome de Patau, que nos apresentou dosagem gênica compatível a uma trissomia.

Utilizando a média dos CTs da amostra controle com o gene *ALB* como referência para o cálculo do número relativo de cópias (NRC) gênicas, pelo método $\Delta\Delta CT$, observamos a presença de deleção no intervalo entre 0,4 – 0,6 e uma dosagem gênica normal entre o intervalo 0,8 – 1,0; o intervalo de 1,5 – 1,7 representa três cópias gênicas comparadas ao indivíduo referência (controle) (Figura 36).

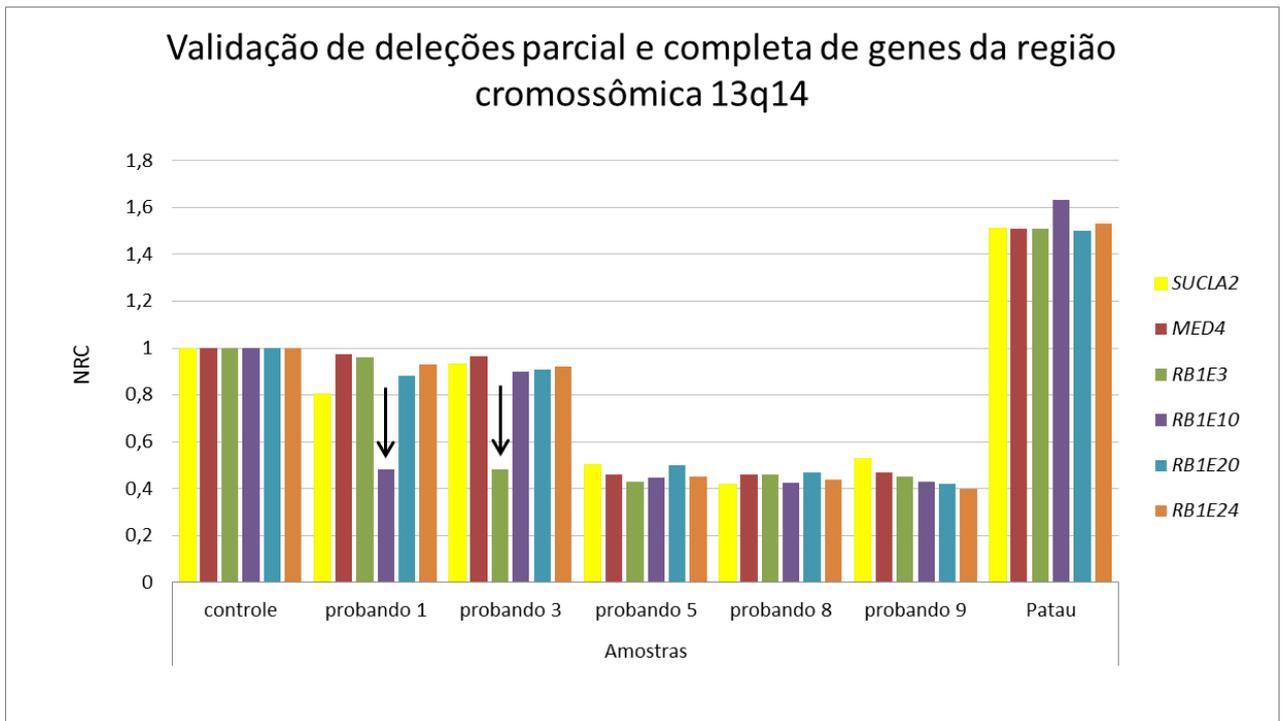


Figura 36: Resultados das dosagens gênicas nos genes *SUCLA2*, *MED4* e *RB1* (éxons 3,10, 20 e 24) em pacientes com retinoblastoma. As setas em negrito indicam a deleção do éxon10 no probando 1 e do éxon 3 no probando 3. Os demais probandos (5, 8 e 9) possuem deleção completa de todos os genes avaliados. Intervalo da deleção 0,4 – 0,6; trissomia 1,5 – 1,7.

A técnica de PCR em tempo real desenhada neste estudo pôde ser utilizada para fortalecer os achados da técnica de MLPA e poderá ser útil no aprimoramento da técnica para práticas rotineiras no rastreamento de deleções no gene *RB1* e genes adjacentes em casos de retinoblastoma e/ou com a síndrome 13q, já que grandes deleções contemplam 5% - 10% dos casos de retinoblastoma.

5.7 Validação das deleções em genes da região cromossômica 13q14 por *Array-CHG*:

Os probandos com deleção completa e parcial do gene *RB1* e genes adjacentes foram também confirmados pela técnica de *Array-CHG*. As imagens da figura 37 mostram a região e o tamanho da deleção de cada probando.

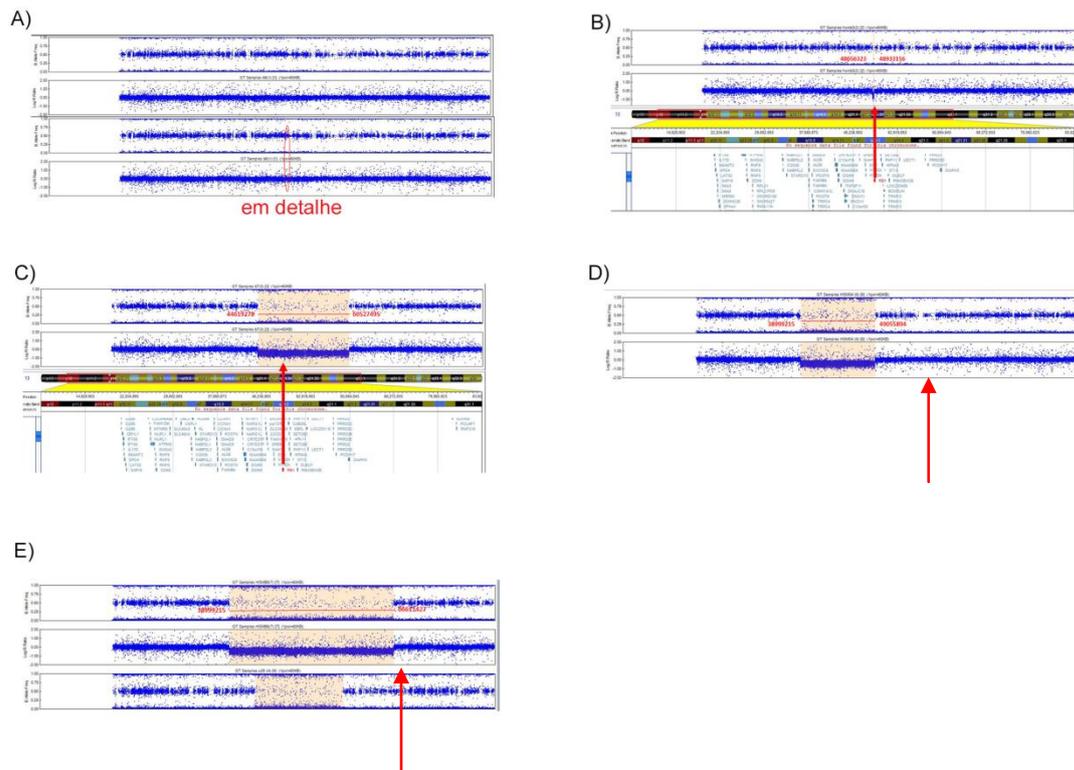


Figura 37: Imagens da técnica de array-CGH dos cinco probandos avaliados. A) Probando 1 possui uma deleção dos éxons 10 - 11, mostrada em detalhe, com tamanho de 1,1 kb; B) Probando 3 possui uma deleção dos éxons 1 – 7 com tamanho de 276 kb; C) Probando 5 possui uma deleção completa do gene *RB1* e região cromossômica 13q, com tamanho de 15,4 Mb; D) Probando 8 possui uma deleção completa do gene *RB1* e região cromossômica 13q, com tamanho de 12,0 Mb; E) Probando 9 possui deleção completa do gene *RB1* e região cromossômica 13q, com tamanho de 27 Mb.

5.8 Genotipagem do polimorfismo rs2066827 no gene *CDKN1B*

As análises dos sequenciamentos do polimorfismo rs2066827 identificaram os genótipos discriminados na tabela 19.

Com o teste do qui-quadrado, verificamos que ambos os grupos encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW). O valor de $\chi^2 = 3,83$, $p = 0,14$ para a coorte de pacientes com retinoblastoma e $\chi^2 = 0$, $p = 1$ para o grupo dos controles, sem valor significativo para p (Tabela 20).

Tabela 9: Distribuição genotípica do rs2066827 no gene *CDKN1B* em 72 pacientes com retinoblastoma que pertencem a coorte e 134 indivíduos sem o tumor.

Genótipos	Pacientes (%)	Controles (%)	Total
TT	36 (50%)	53 (40%)	89
TG	22 (30%)	62 (46 %)	84
GG	14 (20%)	19 (14 %)	33
Total	72	134	206

Tabela 10: Teste do qui-quadrado (χ^2) para os genótipos dos 72 pacientes com retinoblastoma e de 134 indivíduos do grupo controle para o polimorfismo rs2066827 a fim de verificar o equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW).

Pacientes com RB – EHW				
	TT	TG	GG	Total
RB	36 (50%)	22 (30%)	14 (20%)	72
EHW	30 (42%)	33 (46%)	9 (12%)	72
Total	66 (46%)	55 (38%)	23 (16%)	144

Controles – EHW

	TT	TG	GG	Total
Controles	53 (40%)	62 (46%)	19 (14%)	134
EHW	53 (40%)	62 (46%)	19 (14%)	134
Total	106	124	38	268

O mesmo teste foi aplicado para verificar significância estatística entre a coorte e os controles deste trabalho (Tabela 21), obtendo-se $\chi^2 = 4,83$, $p = 0,09$ não havendo diferença estatística entre os grupos para o polimorfismo.

Tabela 11: Teste do qui-quadrado (χ^2) aplicado aos grupos de pacientes com retinoblastoma (72) e controles (134) deste estudo.

Pacientes com RB x Grupo controle				
	TT	TG	GG	Total
Pacientes com RB	36 (50%)	22 (30%)	14 (20%)	72
Controles (2018)	53 (40%)	62 (46%)	19 (14%)	134
Total	89	84	33	206

As frequências alélicas obtidas para os grupos avaliados apresentaram valor de $\chi^2 = 0,27$, $p = 0,60$ com p não significativo (Tabela 22).

Tabela 12: Teste do qui-quadrado (χ^2) para as frequências alélicas dos grupos (pacientes com RB e controles).

Frequência alélica: pacientes com RB x controles

	T	G	Total
Pacientes com RB	94 (65%)	50 (35%)	144
Controles (2018)	168 (63%)	100 (37%)	268
Total	262	150	412

A presença do alelo minoritário (alelo G), com valores de MAF 0,35 no grupo de pacientes com retinoblastoma e 0,37 nos controles, não alterou a chance de desenvolver retinoblastoma ou de conferir um efeito protetor no modelo genético testado.

Longuini et al. (2014) investigaram o polimorfismo rs206687 e a associação com o fenótipo em pacientes brasileiros que possuem síndrome de Neoplasias Endócrinas Múltiplas tipo 1 (NEM1) e mutação germinativa no gene *MEN1*, onde foi incluído no estudo um grupo controle com 885 indivíduos idosos sem tumor, distribuídos em 54% de mulheres e 46% de homens, com idade média de 65,2 anos, sendo da mesma demografia e etnia. Nós utilizamos este mesmo grupo controle para fazer uma comparação com nosso grupo de pacientes com retinoblastoma, e verificamos uma diferença estatisticamente significativa para $p < 0,05$ ($\chi^2 = 6,75$ e $p = 0,03$) (Tabela 23).

Tabela 13: Teste do qui-quadrado (χ^2) para o grupo de pacientes com retinoblastoma (72) e o grupo controle (885) utilizado no estudo de Longuini et al. (2014) para o polimorfismo rs2066827.

	TT	TG	GG	Total
Pacientes com RB	36 (50%)	22 (30%)	14 (20%)	72
Controles Longuini et al., 2014	363 (41%)	406 (46%)	116 (13%)	885
Total	399	428	130	957

As frequências alélicas avaliadas para ambos os grupos, utilizando o mesmo teste estatístico, não demonstrou significância estatística ($\chi^2= 0,10$ e $p= 0,75$) (Tabela 24).

Tabela 14: Teste do qui-quadrado (χ^2) para as frequências alélicas dos grupos de pacientes com retinoblastoma e controles de Longuini et al., 2014.

Frequência alélica: pacientes com RB x controles Longuini et al. (2014)			
	T	G	Total
Pacientes com RB	94 (65%)	50 (35%)	144
Controles Longuini et al., 2014	1132 (64%)	638 (36%)	1770
Total	1226	688	1914

6 Discussão

6.1 Características clínicas de pacientes com retinoblastoma

As informações clínicas coletadas dos 148 pacientes com retinoblastoma foram resumidas e estão mostradas na tabela 9. A proporção de casos com a forma unilateral e bilateral ficou próxima à da análise estimada por Knudson (1971), que menciona 60% para os casos de retinoblastoma unilateral e 40% para os casos bilaterais (Knudson, 1971; Mateu et al., 1997; Frenkel et al., 2016). Não se observou predominância de sexo entre os pacientes, nem realizada associação com a lateralidade da doença, conforme a literatura, também, tem sugerido nos últimos anos (Balmer et al., 2006; Selistre et al., 2016).

Na presente pesquisa, 10% dos pacientes apresentaram histórico familiar para retinoblastoma, enquanto os casos bilaterais totalizaram 40%. Frequentemente, a predisposição genética ao retinoblastoma comporta-se como uma doença autossômica dominante com alta penetrância (90%) em que pessoas com histórico familiar positivo para esta doença tenderiam a desenvolver o retinoblastoma bilateral ou unilateral multifocal. Contudo, em alguns casos, o retinoblastoma hereditário pode apresentar baixa penetrância e variável expressividade. Assim, em uma família desse tipo, por exemplo, pode ocorrer a forma unilateral do retinoblastoma, ou seja, reduzida expressividade da doença (Kalsoon et al., 2015).

Os sintomas mais frequentemente observados foram a leucocoria (73%) e o estrabismo (12%), conforme relatado anteriormente por Pandey et al. (2014) que apontaram a presença de leucocoria e estrabismo em 60% e 20%, respectivamente, nos casos estudados.

A maioria dos pacientes (32%) foi diagnosticada em estádios avançados da doença (tumores dos grupos D/E e IV/V), o que também foi observado no estudo de Selistre et al. (2016). A pesquisa conduzida neste trabalho mostrou alta taxa de enucleação (83%) como forma terapêutica associada ao estadiamento da doença. A enucleação é ainda muito utilizada, em razão do avançado estágio da doença no momento do diagnóstico (Ali et al., 2018). Contudo, as demais formas terapêuticas vêm sendo amplamente utilizadas e com resultados satisfatórios.

Cabe ressaltar que o sucesso na abordagem do diagnóstico de pacientes com retinoblastoma requer enfoque multidisciplinar. Shields et al. (2013) relatam estudos em que foram avaliados diagnósticos pautados na histopatologia de olhos enucleados, em 355 enucleações, sendo que 19 (5%) não mostraram evidência de retinoblastoma. Isso significa que é preciso atenção para os sinais e sintomas que se confundem com pseudoretinoblastoma.

Os casos hereditários de retinoblastoma são frequentemente detectados mais precocemente e, portanto, em estádios menos avançados. Esse prognóstico favorável é, de certo modo, facilitado pela realização de exames periódicos. Foi observado neste trabalho que a média de encaminhamento é de 6,3 meses. Palazzi et al. (2013) evidenciam que o tempo de encaminhamento maior que 6 meses está associado ao risco de enucleação.

Ressaltaram-se na presente pesquisa três casos diagnosticados, entre os anos de 2011 e 2014, com a forma trilateral da doença. Os três foram a

óbito, entre 28 a 43 meses de encaminhamento. Selistre et al. (2016) descreveram dois desses casos encontrados em um total de 141 pacientes com retinoblastoma, em um período de nove anos de estudo.

Mais de 50% dos casos do retinoblastoma trilateral são diagnosticados com imagem de ressonância magnética, sugerindo-se que o rastreamento para essa forma da doença pode ser muito útil (Jong et al., 2015). As ocorrências são raras, razão de se encontrar na literatura poucos trabalhos que detalham a genética molecular desses casos, o que evidencia a importância dessa associação.

Nesta coorte, mesmo com alta taxa no estágio avançado da doença, 6% probandos foram a óbito. A sobrevivência dos pacientes com retinoblastoma tem aumentado gradativamente nos últimos anos, principalmente, pela introdução de múltiplas modalidades de tratamento (Shields et al., 2013). A mortalidade em países em desenvolvimento chegava a 70% após o aparecimento dos primeiros sinais (Dimaras et al., 2008; Li et al., 2016), mas no caso brasileiro essa taxa vem sofrendo redução devido as novas modalidades terapêuticas disponíveis. O prognóstico, porém, permanece relativamente insipiente para pacientes com disseminação da doença e para os casos de retinoblastoma trilateral (Jurkiewicz et al., 2010; Dimaras e Corson, 2017).

Quanto mais precoce o diagnóstico, menor a extensão da doença, maiores os índices de cura e há redução nos efeitos adversos decorrentes da terapêutica, seja em curto ou em longo prazo. O diagnóstico precoce é um dos principais aliados na determinação da cura do paciente portador de retinoblastoma.

6.2 Alterações no rastreamento do gene *RB1*

A partir do rastreamento das 11 amostras de pacientes com retinoblastoma, que compõem o grupo prospectivo, identificamos 20 variantes. Neste grupo não foram detectadas mutações germinativas. Dehainault et al. (2007) sugerem que, quando mutações em *RB1* não são detectadas em casos de retinoblastoma hereditário, o cDNA deve ser investigado, uma vez que foi identificada uma inserção intrônica a 103 pb, entre os éxons 23 e 24 do gene *RB1*, a qual gerou a criação de um sítio críptico, resultando na permanência do íntron (Dehainault et al., 2007). Essa referência suscita um dado bastante relevante, uma vez que diversas variantes intrônicas têm sido relatadas no gene *RB1* (Lohmann et al., 1996).

Duas variantes exônicas foram observadas no rastreamento dos 11 probandos, com efeito deletério para ambas conforme sugerido pelas análises *in silico* (Tabela 13).

A variante c.848 G>T não é descrita previamente. Na posição c.848 do transcrito, no banco de dados LOVD (<http://www.lovd.nl/3.0/search>) estão descritas três mutações: uma deleção germinativa (c.848_852del), e duas deleções somáticas (c.848_861del e c.848_861+5del). Não há outras mutações descritas nesta posição, portanto, a alteração c.848 G>T é considerada nova.

O polimorfismo rs2854351 T>C (íntron 1) foi encontrado em 9 probandos. No banco de dados, o alelo minoritário T apresenta frequências de 100% nas populações europeias, do Leste e Sul Asiático (NCBI, 2018).

O SNP rs2252544 G>A (íntron 1), detectado em 6 probandos, apresenta frequência alélica, distribuída entre os alelos G e A nas diversas populações continentais, exceto na África, onde o alelo A aparece em menor proporção (9%). Dommering et al. (2014) detectaram em suas pesquisas 12 casos com essa variante (12/ 1173), nos Países Baixos, em pacientes com retinoblastoma, sendo 7 casos em homozigose e 5 em heterozigose. Além do retinoblastoma, essa variante também foi observada em pacientes com câncer de próstata e em indivíduos não portadores da doença (Oliveira et al., 2016), sem demonstrar diferenças estatisticamente significantes para as frequências alélicas observadas no estudo.

O alelo T do polimorfismo rs520342 C/T (íntron 3) foi encontrado em 5 probandos e possui efeito benigno. Outros pesquisadores também identificaram essa variante em retinoblastoma (Blanquet et al., 1995; Mateu et al., 1997; Barbosa et al., 2013). No entanto, 37 indivíduos não portadores da doença foram identificados com esse polimorfismo na Índia (Sivakumaran et al., 2005). O SNP rs198617 T>G (íntron 4), identificado em 11 probandos, também possui efeito benigno com alelo minoritário T. Em populações da América, Leste e Sul Asiático, e Europa o alelo selvagem T possui as menores frequências alélicas, sendo o alelo G predominante nas populações dessas regiões (NCBI, 2018). Em outros estudos visando ao retinoblastoma, encontrou-se esse polimorfismo em indivíduos acometidos e no grupo controle (Blanquet et al., 1995; Mateu et al., 1997; Sivakumaran et al., 2005).

No polimorfismo rs3092883 G/A (íntron 10), observado em dois probandos, o alelo minoritário A não é encontrado em populações da Ásia e Europa, enquanto o alelo selvagem G possui alta frequência em países da África, nas Américas, na Ásia e Europa (NCBI, 2018). Estudos de Sivakumaran et al. (2005) apontam este SNP para um indivíduo sem retinoblastoma, na

África; e Barbosa et al. (2013) observaram a mesma variante em um probando (1/ 59) de uma coorte de retinoblastoma.

O alelo T da variante rs185587 G/T foi encontrado em quatro probandos, sendo já identificado por Kalsson et al. (2015) em um probando (1/ 70) com retinoblastoma. Varley e Mitra (2008) detectaram o mesmo SNP em tecidos de adenocarcinoma de cólon e normal adjacente, não demonstrando diferenças estatisticamente significativas para a variante nos dois grupos de análise (Varley e Mitra, 2008). Nos controles populacionais de todos os continentes, Sivakumaran et al. (2005) encontraram oito indivíduos não portadores de retinoblastoma com a variante (8/ 137).

O polimorfismo rs2070752 G>C (íntron 14-15) foi observado em quatro probandos e frequência alélica de G= 0,27 (1000Genomes) demonstrando maior frequência para o alelo alterado. O SNP rs191504668 C/T (íntron 14-15), detectado em dois probandos, possui frequência alélica de T igual a zero nas diversas populações (NCBI, 2018).

As variantes rs145544222 G/A (íntron 17) e rs147342515 C>T (íntron 15-16), encontradas em um probando, não tiveram as frequências alélicas populacionais informadas (NCBI, 2018).

A variante rs198580 G>A (íntron 19), identificada em 5 probandos, foi detectada em estudos anteriores. Sivakumaran et al. (2005) detectaram a presença do alelo A em 14 indivíduos de diferentes regiões geográficas, em um grupo de 137 indivíduos, não portadores de retinoblastoma, provenientes da Europa, África, Ásia, das Américas e da Oceania, com frequência alélica de 0,95 para o alelo A (Sivakumaran et al., 2005), sendo a ocorrência descrita, também, no estudo de Barbosa et al. (2013), em uma coorte de retinoblastoma.

Outro SNP, rs3092904 T>A (íntron 25), presente em dois probandos do presente estudo, apresenta efeito benigno e também frequências maiores que 1% nas diversas populações (ClinVar; Sivakumaran et al., 2005). Kalsoon et al. (2015) identificaram esse SNP em um probando de retinoblastoma (1/ 70).

O SNP rs3020646 C>T (íntron 25) foi identificado em 10 probandos desta pesquisa, sendo o alelo minoritário (C) frequente em menos que 1% da população no Leste Asiático, e classificada como variante benigna (NCBI, 2018). Barbosa et al. (2013), igualmente, identificaram essa variante em sua coorte de retinoblastoma. Esse mesmo SNP foi detectado em 13 indivíduos não portadores de retinoblastoma na Índia, com frequência alélica 0,05 para o alelo C (Sivakumaran et al., 2005) enquanto Varley e Mitra (2008) o detectaram em tecido de adenocarcinoma de cólon e no tecido normal adjacente, não representando um marcador para o tecido neoplásico (Varley e Mitra, 2008).

A variante c.1814+72 T>A (g.48453183), localizada no íntron 18, foi detectada em três probandos em heterozigose neste estudo. Nos bancos de dados, observou-se que o polimorfismo rs549786289 se encontra localizado na mesma posição que a variante foi identificada com alterações de T > G e T > C, mas não T > A indicando uma nova descrição, o que realça os achados deste estudo.

As variações de sequência intrônica sem descrição prévia foram verificadas em preditores *in silico* com o objetivo de observar sua possível consequência na função da proteína, sugerindo um efeito neutro ou benigno.

6.3 Modelagens moleculares das mutações na proteína RB

O complexo formado pRB – E2F mantém-se unido por muitas interações fracas, do tipo interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e uma ponte salina. O sítio ativo da proteína retinoblastoma é composto pelos domínios A e B mais o domínio C-terminal, que formam o *pocket* das proteínas pertencentes à família RB, ao qual o fator E2F pode se ligar. Especificamente, o E2F liga-se às hélices α_4 , α_5 , α_6 , α_8 e α_9 do domínio A; e liga-se apenas à hélice α_{11} do domínio B (Chemes, 2010).

Apenas 18 resíduos (409 – 426) do E2F estão envolvidos no complexo pRB – E2F, sendo essenciais somente estes cinco: Tyr411, Leu424, Phe425, Glu419 e Asp423. Mutações em qualquer um desses resíduos poderiam causar o comprometimento do complexo pRB – E2F, pois estão relacionados à associação a pRB que, conseqüentemente, levaria à desativação da função reguladora da proteína retinoblastoma e permitiria a dissociação do complexo e promoveria a progressão do ciclo celular para a fase S (Chemes, 2010).

Contudo, observa-se, pelos modelos estruturais obtidos, que duas mutações germinativas são causadoras de *stop* códon e ocasionam perda de função da pRB, pois o domínio *pocket* é perdido, sendo associados com a alta penetrância do retinoblastoma (Price et al., 2014). A mutação pontual identificada no éxon 17 promove a alteração de uma alanina para uma glicina na posição 525. Essa mutação não gera comprometimento da função proteica, pois os resíduos de aminoácidos alterados possuem grupamentos químicos muito parecidos, o que acaba suavizando a mutação. Por fim, cabe ressaltar que mutações em *RB1* que proporcionam mutações *stop* códon levam ao

retinoblastoma bilateral, na maioria dos casos, conforme observado na casuística de Carvalho (2017) (Tabela 14) (Mitter et al., 2011).

6.4 Revisão sistemática da literatura para os casos da síndrome 13q14 com retinoblastoma

A partir da revisão sistemática da literatura para os casos de deleção 13q14, em 61% dos casos observou-se deleção completa do gene *RB1* e 39% de deleções parciais. Em função dessa grande heterogeneidade no tamanho das deleções, desenvolveu-se uma metodologia para quantificar o número de cópias do gene *RB1*. Para tanto, foram desenhados iniciadores correspondentes aos éxons 3, 10, 20 e 24 do *RB1*, além de iniciadores dos genes *SUCLA2* e *MED4*, localizados na região 13q14. A seleção dos referidos éxons provém dos éxons observados nos casos de deleções avaliados, com deleções parciais e pontos de quebra identificados nos estudos da literatura (Tabela 18). Além disso, com uma representatividade de 61% dos casos de deleção completa para os genes da região 13q14, o desenvolvimento da padronização da técnica de PCR em tempo real, para o número relativo de cópias gênicas, torna-se uma ferramenta útil para identificar pacientes com deleções, que permitiram validar os casos de deleção em pacientes com retinoblastoma, anteriormente detectados, sendo de fácil e rápida utilização.

Os casos com deleções parciais possuem prevalência de bilateralidade com idade ao diagnóstico em torno dos 18 meses, o que corrobora a teoria de

Knudson (1971), em relação à lateralidade e a manifestação dos primeiros sinais da doença.

6.5 Dosagens gênicas dos genes *SUCLA2*, *MED4* e *RB1*

Para analisar a presença de deleções envolvendo os genes *SUCLA2*, *MED4* e *RB1*, localizados na região cromossômica 13q14, estabeleceu-se um método de PCR quantitativa relativa, com base na detecção por Sybr Green. Esse método possibilitou identificar precisamente indivíduos não portadores de retinoblastoma em uma amostra controle, por meio do número de cópias observado. Aplicando este método nas 5 amostras selecionadas, identificaram-se três probandos com deleção completa de todos os genes avaliados –*RB1*, *SUCLA2* e *MED4*, representando 5% dos pacientes (3/ 64), e dois probandos com deleção parcial do *RB1* – éxons 10 e 11 e, éxons 1 – 7, que equivalem a 3% (2/ 64).

A técnica de *array*-CGH confirmou as deleções observadas nos métodos de MLPA e PCR em tempo real. Os probandos 1 e 3 possuem deleção intragênica do gene *RB1* de aproximadamente 1 kb envolvendo os éxons 10 e 11, e 276 kb entre os éxons 1 – 7; os probandos 5, 8 e 9 com deleção completa dos genes *RB1*, *SUCLA2* e *MED4* variam de 12 – 27 Mb.

Nos probandos aqui estudados, foram identificados mais casos com a forma bilateral do retinoblastoma. Na literatura, constatou-se a descrição de maior prevalência para os casos de retinoblastoma bilateral em relação à forma

unilateral com deleção completa e parcial no gene *RB1* (Ahani et al., 2013). Mitter et al. (2011), também encontraram maior frequência de tumores bilaterais associados a deleções em 13q14, em detrimento de tumores unilaterais em uma coorte de 63 pacientes diagnosticados com deleção, envolvendo a banda 13q. Esses achados não estão em conformidade com a hipótese de Matsunaga et al. (1980) e Bunin (1989) que correlacionaram a maior proporção de casos de retinoblastoma unilateral em portadores de deleção 13q14, comparada a outros pacientes com retinoblastoma hereditário. Nesse sentido, Baud et al. (1999) relatam 22 pacientes com retinoblastoma e deleção em 13q14, dos quais 13 casos são da forma unilateral da doença. Sendo assim, o trabalho de Mitter et al. (2011) foi esclarecedor no que se refere à prevalência da forma bilateral da doença, quando associada a deleções na região 13q14.

Ainda, foi possível observar que os casos de deleção possuem uma prevalência quanto à lateralidade, em relação à localização da quebra. Nesta revisão sistemática da literatura a que se procedeu, em pacientes com deleções intragênicas, parciais, 43 casos (98%) desenvolveram a forma bilateral e apenas um probando (2%) a forma unilateral; enquanto, nas deleções completas, 44 casos (65%) são bilaterais e 23 (34%) unilaterais. Richter et al. (2013) observaram 15 probandos com deleção completa do *RB1*, sendo 11 (73%) com a forma bilateral da doença (Richter et al., 2013).

No estudo de Mitter et al. (2011), todos os pacientes com um ponto de quebra dentro do *RB1* tiveram a forma bilateral da doença e, ao comparar os tamanhos das deleções, observou-se o retinoblastoma unilateral em deleções maiores que 1 Mb. O tamanho da deleção pode ainda ser associado aos diferentes fenótipos encontrados para a síndrome 13q14.

No presente estudo, o probando 5 apresentou deleção maior que 1 Mb, e mostrou desenvolvimento neurológico e psicomotor normais. Em geral, conforme descrito por Brennan et al. (2016), pacientes com deleção 13q possuem fenótipos variáveis, exibindo um espectro de características dismórficas e neurológicas. Pequenas deleções limitadas à banda q14 são associadas com o desenvolvimento neurológico normal durante a infância (Baud et al., 1999). É o que mostra Caselli et al. (2007), em um probando com retinoblastoma multifocal no olho esquerdo, diagnosticado aos 31 meses de vida, e características clínicas normais com uma pequena deleção (1.7 Mb). Além deste, três outros casos são apresentados. Um probando com deleção de 200 kb e a forma unilateral da doença no olho direito, diagnosticado aos 67 meses de idade e moderado retardo mental. Dois outros probandos com grandes deleções (19 e 36 Mb) apresentaram fenótipos variados, incluindo dismorfia craniofacial, decaimento psicomotor, hipotonia, baixa estatura e anomalias nas falanges com retinoblastoma bilateral, diagnosticado aos 5 meses de idade e retinoblastoma unilateral no olho direito, aos 10 meses de vida, respectivamente (Caselli et al., 2007).

Não se sabe exatamente se genes específicos da região 13q14 afetam características fenotípicas específicas, encontradas em pacientes com retinoblastoma (Caselli et al., 2007; Mitter et al., 2011). Ainda, em relação ao fenótipo mais severo encontrado em pacientes com deleções na região cromossômica 13q, Caselli et al. (2007) observaram que a deleção distal envolvendo a banda q32 é fenotipicamente caracterizada por retardo mental e malformações mais severas; a deleção proximal, envolvendo a banda q14, poderia ser associada ao desenvolvimento de retinoblastoma e retardo mental (Caselli et al., 2007). A gravidade associada à região q32 foi hipotetizada por

essa região conter genes que são fundamentais para a formação de tecidos e órgãos cerebrais (Brown et al., 1995).

Em relação ao gene adjacente *MED4*, estudos conduzidos em linhagens celulares de retinoblastoma consideraram esse gene como de sobrevivência da célula, tendo sido demonstrado *in vitro* que células com a dupla inativação do gene *RB1* não sobreviveram na ausência homozigótica do gene *MED4*. Nesse sentido, foi proposto que a perda desse gene poderia explicar a baixa penetrância de retinoblastoma em pacientes com grandes deleções que incluem as regiões dos genes *RB1* e *MED4*. Em conclusão, o gene *MED4* é considerado extremamente relevante para o desenvolvimento do retinoblastoma (Dehainault et al., 2014). Assim, os probandos com deleção completa de genes na região cromossômica 13q14, também, são heterozigóticos para este gene.

O gene *MED4* foi identificado como gene de sobrevivência, explicando a baixa penetrância da doença observada em uma família onde o pai e a filha não são afetados pelo retinoblastoma enquanto o filho é afetado com a forma bilateral da doença, sendo que os três possuem deleção completa do *RB1*, demonstrando uma baixa penetrância associada à ausência do gene *MED4*, que explicaria a baixa penetrância do retinoblastoma nesta família.

Por definição, um gene de sobrevivência precisa ser expresso, codificado, para o tumor se desenvolver. Além do gene *MED4*, outro gene, o *NUDT15*, que não foi investigado neste trabalho, é considerado vulnerável a baixa penetrância, quando se encontra deletado. Essa hipótese foi demonstrada em experimentos direcionados à perda de função desses genes mediante RNAi em linhagens celulares de retinoblastoma –Y79 e WERI. O gene *NUDT15* em linhagens Y79 não induziram apoptose nem afetaram a

proliferação celular, indicando que esse gene não é essencial para o desenvolvimento do retinoblastoma. Em contraste, o gene *MED4* quando expresso em baixos níveis é capaz de induzir apoptose em ambas as linhagens celulares, comparado à cultura celular controle, indicando que *MED4* é necessário para o amparo do crescimento de células de retinoblastoma (Dehainault et al., 2014).

Em relação ao segundo gene adjacente, *SUCLA2*, este pode ser associado a encefalomiopatia e retinoblastoma bilateral. Em um grupo de 42 pacientes com retinoblastoma e fenótipos neurológicos variados, devido a deleções 13q, 27 pacientes tiveram deleções envolvendo o *SUCLA2* (Matilainen et al., 2015). Em nosso estudo, três probandos com deleção na região 13q14 (probandos 5, 8 e 9) também mostraram deleção completa desse gene, identificados pelas técnicas de MLPA e PCR em tempo real. De acordo com Matilainen et al. (2015) o gene *SUCLA2* pode ser a causa das deficiências neurológicas, em pacientes com retinoblastoma e deleção na região 13q14 (Matilainen et al., 2015).

Neste estudo, os probandos com deleção completa, variando de 12 a 15.4 Mb, além de serem bilaterais, possuem deleção também dos genes *SUCLA2* e *MED4*, o que não vai ao encontro do estudo de Mitter et al. (2011), para a prevalência de casos unilaterais de retinoblastoma, quando maiores que 1 Mb e penetrância incompleta da doença nos casos de deleção do *MED4*.

6.6 Genotipagem do polimorfismo rs2066827 no gene *CDKN1B*

O gene *CDKN1B* abriga numerosos polimorfismos que, em vários tumores, têm sido variavelmente associados à progressão da doença e ao desfecho clínico dos pacientes (Lu et al., 2015). Especificamente, o polimorfismo rs2066827 demonstrou ter um efeito protetor na sobrevida global dos pacientes com câncer pancreático esporádico (Chen et al., 2009). Pesquisas posteriores em tumores de diferentes origens produziram resultados conflitantes, deixando sem resposta conclusiva se o polimorfismo rs2066827 está associado a um melhor ou pior prognóstico.

O SNP rs2066827, localizado no éxon1 do gene *CDKN1B*, promove a substituição de uma timina para uma guanina (T>G) na posição 326 e que corresponde a uma alteração do aminoácido valina para glicina na posição 109 (V109G), com efeito benigno (Guan et al., 2010; Landa et al., 2010; Pasquali et al., 2011).

Ambos os grupos avaliados no estudo estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg e as frequências alélicas entre eles se mantiveram constantes, não havendo diferença significativa para $p < 0,05$. Assim, utilizando esses grupos de análise, não houve evidência suficientemente forte para uma possível associação do polimorfismo como potencializador do desenvolvimento de retinoblastoma ou efeito protetor contra a doença. Uma justificativa poderia ser em relação ao tamanho amostral dos casos de retinoblastoma, que poderá ser ampliado em estudos subsequentes e reavaliado.

Por outro lado, quando extrapolamos nossa investigação para o grupo controle de Longuini et al. (2014), observamos que o grupo encontra-se em

equilíbrio de Hardy-Weinberg e, ao comparar a distribuição de genótipos com os pacientes diagnosticados com retinoblastoma, foi obtido um valor de $p < 0,05$ significativo, com diferenças significativas no genótipo dos grupos de portadores da doença e controles brasileiros do estudo de 2014. No entanto, avaliando a frequência alélica de ambos os grupos, tal diferença torna-se não significativa para $p < 0,05$. Nesse sentido, essa investigação não permite associar a troca de bases T>G como condição que leva à susceptibilidade ou efeito protetor no retinoblastoma.

Na investigação de Pasquali et al. (2011), em carcinoma medular esporádico de tireoide, as frequências alélicas entre o tipo selvagem e o polimórfico rs2066827 não demonstraram diferença significativa entre os probandos e controles. A lei de Hardy-Weinberg é importante, porque permite determinar quanto e como o equilíbrio de uma população está sendo afetado pelos fatores evolutivos.

Neste trabalho, foram observados na coorte 50% (36/ 72) com o genótipo TT, 30% (22/ 72) para o genótipo TG e 20% (14/ 72) para GG; enquanto no grupo controle identificaram-se 40% (53/ 134) para o genótipo TT, 46% (62/ 134) TG e 14% (19/ 134) para o genótipo GG. Logo, a condição heterozigótica TG foi encontrada em maior proporção no grupo controle em relação ao grupo de indivíduos acometidos pela doença. Contudo, é válido ressaltar que o teste estatístico não apontou significância, cabendo apenas a observação destes dados. No entanto, Lu et al. (2015), ao realizar uma meta-análise com 9.038 casos e 11.596 controles, envolvidos em 17 estudos, apontam para um efeito protetor em câncer, quando presente o genótipo TG em grupos controle de diferentes tipos de tumores.

O possível efeito protetor associado ao genótipo heterozigótico TG observado na meta-análise de Lu et al. (2015) pode ser verificado em maior casuística, como indica o presente estudo.

7 Conclusão

No presente estudo foi realizada a pesquisa de mutações germinativas no gene *RB1* em 11 probandos com retinoblastoma, onde foram identificadas 20 variantes, 6 delas não previamente descritas.

As ferramentas de modelagem molecular comparativa são muito úteis na visualização de estruturas quaternárias que compõem a proteína. É o que se observou com a pRB, mediante mutações do tipo *stop* códon (p.R255X, p.R251X) que afetam o domínio *pocket*, responsável por interagir com o fator de transcrição E2F, afetando o ciclo celular.

Foi desenhada uma metodologia para estimar o número de cópias gênicas para os genes *RB1*, *SUCLA2* e *MED4* através de PCR em tempo real e também realizamos o *array*-CGH para as mesmas amostras, que conformaram os resultados prévios obtidos pela técnica de MLPA e foi possível estimar o tamanho das deleções.

Com a revisão da literatura foi possível determinar a prevalência de deleções do gene *RB1* e sua correlação com lateralidade tumoral. A frequência de deleções em diferentes coortes variou de 5% - 10%. Devido ao pequeno número de estudos disponíveis para análise não foi possível determinar a existência de possível associação entre lateralidade e tamanho da deleção, assim como com a deleção concomitante dos genes adjacentes *SUCLA2* e *MED4*.

O polimorfismo rs2066827 localizado no gene *CDKN1B* não modificou o fenótipo nos pacientes diagnosticados com retinoblastoma, não exercendo

efeito de susceptibilidade ou efeito protetor nos indivíduos acometidos pela doença quando comparado com a amostra de controles investigada no presente estudo. Contudo ao compararmos os indivíduos afetados com retinoblastoma e uma amostra de controles brasileiros, descritos no trabalho de Longuini et al. (2014) para o mesmo polimorfismo, houve uma diferença estatisticamente significativa na distribuição dos genótipos. Porém, as frequências alélicas foram não significativas. Além disso, essa análise nos chamou a atenção para a maior prevalência do genótipo heterozigótico, alelos T e G, em indivíduos controles em detrimento dos indivíduos acometidos pela doença. Assim, alguns estudos apontam para um possível efeito protetor do genótipo heterozigótico em indivíduos controles em diferentes tipos de neoplasias.

8 Referências Bibliográficas

- Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nature Methods*. 2010; 7(4), 248-249.
- Aerts I, Rouic LLL, Gauthier-Villars M, Brisse H, Doz F, Desjardins L. Retinoblastoma. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 2006; 1:31.
- Aguilar V and Fajas L. Cycling through metabolism. *EMBO Mol*. 2010; 2(9), 338–348.
- Ahani A, Akbari MT, Saliminejad K, Behnam B, Akhondi MM, Vosoogh P et al. Screening for large rearrangements of the *RB1* gene in Iranian patients with retinoblastoma using multiplex ligation-dependent probe amplification. *Mol Vision*. 2013; 19: 454-462.
- Alberts B, Jhonson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter, P. *Biologia Molecular da Célula*. 5ª ed. Porto Alegre: Artmed; 2010.
- Albrecht P, Ansperger-Rescher B, Schüller A, Zeschnigk M, Gallie B, Lohmann DR. Spectrum of gross deletions and insertions in the *RB1* gene in patients with retinoblastoma and association with phenotypic expression. *Human Mutat*. 2005; 26(5), 437-445.
- Ali AA, Kletke S, Gallie B, Lam W-C. Retinoblastoma for pediatric ophthalmologists. *Asia-Pac J Ophthalmol*. 2018; 7:00.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 1990; Oct 5; 215(3): 403-10.
- Antoneli CBG, Steinhorst F, Ribeiro KCB, Erwenne CM, Novaes PERS, Arias V et al. Evolução da terapêutica do retinoblastoma. *Arq Bras Oftalmol*. 2003; 66: 401-8.
- Ayari-Jeridi H, Moran K, Chebbi A, Bouguila H, Abbes I, Charradi K et al. Mutation spectrum of *RB1* gene in unilateral retinoblastoma cases from Tunisia

and correlations with clinical features. PlosOne. 2015; DOI:10.1371/journal.pone.0116615.

Bader JL, Miller RW, Meadows AT, Zimmerman LE, Champion LA, Voute PA. Trilateral retinoblastoma. Lancet. 1980; 2:582–583

Balmer A, Zografos L, Munier F. Diagnosis and current management of retinoblastoma. Oncogene. 2006; 25, 5341-5349.

Barbieri RB, Bufalo NE, Secolin R, Assumpção LVM, Maciel RMB, Cerutti JM et al. Polymorphisms of cell cycle control genes influence the development of sporadic medullary thyroid carcinoma. European Journal of Endocrinology. 2014; 171, 761-767.

Barbosa RH, Aguiar FCC, Silva MFL, Costa RA, Vargas FR, Lucena E et al. Screening of *RB1* alterations in Brazilian patients with retinoblastoma and relatives with retinoma: phenotypic and genotypic associations. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2013; 54:3184-3194.

Baud O, Cormier-Daire V, Lyonnet S, Desjardins L, Turleau C, Doz F. Dysmorphic phenotype and neurological impairment in 22 retinoblastoma patients with constitutional cytogenetic 13q deletion. Clin Genet. 1999; 55: 478-482.

Beck Popovic M, Balmer A, Maeder P et al. Benign pineal cysts in children with bilateral retinoblastoma: a new variant of trilateral retinoblastoma? Pediatric Blood Cancer. 2006; 46:755–761.

Bell LA and Ryan KM. Life and death decisions by E2F-1. Cell Death and Differentiation. 2004; 11, 137142.

Benavante CA and Dyer MA. Genetics and Epigenetics of Human Retinoblastoma. Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis. 2015; 10:547-62.

Blanquet V, Turleau C, Gross-Morand MS, Sénamaud-Beaufort C, Doz F, Besmond C. Spectrum of germline mutations in the *RB1* gene: a study of 232

patients with hereditary and non hereditary retinoblastoma. *Human Molecular Genetics*. 1995; 4(3); 383-388.

Braggio E, Bonvicino CR, Vargas FR, Ferman S, Eisenberg ALA, Seuánez HN. Identification of three novel *RB1* mutations in Brazilian patients with retinoblastoma by “exon by exon” PCR mediated SSCP analysis.

Brennan RC, Qaddoumi I, Billups CA, Kaluzny T, Furman WL, Wilson MW. Patients with retinoblastoma and chromosome 13q deletions have increased chemotherapy-related toxicities. *Pediatr Blood Cancer*. 2016.

Brown S, Russo J, Chitayat D, Warburton D. The 13q syndrome: The molecular definition of a critical deletion region in band 13q32. *Am. J. Hum. Genetics*. 1995; 57:859-866.

Bunin GR, Meadows AT, Emanuel BS, Buckley JD, Woods WG, Hammond GD. Pre- and postconception factors associated with sporadic heritable and nonheritable retinoblastoma. *Cancer Research*. 1989; 49:5730-5735.

Burke JR, Hura GL, Rubin SM. Structures of inactive retinoblastoma protein reveal multiple mechanisms for cell cycle control. *Genes & Development*. 2012; 26: 1156-1166.

Campos Júnior M. O gene *MECP2* e a função neurocognitiva humana: rastreamento de mutações em pacientes com retardo mental de etiologia desconhecida. [Tese]. Rio de Janeiro: Universidade do Estado do Rio de Janeiro; 2009.

Carvalho INRS, Reis AHO, Cabello PH, Vargas FR. Polymorphism of *CDKN1A* gene and risk of retinoblastoma. *Carcinogenesis*. 2013.

Carvalho INRS, Freitas RM, Vargas FR. Translating microRNAs into biomarkers: what is new for pediatric cancer? *Medical Oncology*. 2016; 33:49.

Carvalho INRS. Caracterização de mutações e polimorfismos no gene *RB1* e nas famílias miR-34 e miR-183 em portadores de retinoblastoma. [Tese]. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2017.

Caselli R, Speciale C, Pescucci C, Uliana V, Sampieri K, Bruttini M et al. Retinoblastoma and mental retardation microdeletion syndrome: clinical characterization and molecular dissection using array CGH. *J. Hum Genet.* 2007; 52:535-542.

Chang B-L, Zheng SL, Isaacs SD, Wiley KE, Turner A, Li G et al. A polymorphism in the *CDKN1B* gene is associated with increased risk of hereditary prostate cancer. *Cancer Research.* 2004; 64:1997-1999.

Chantada G, Fandinó A, Manzitti J, Urrutia L, Schvartzman E. Late diagnosis of retinoblastoma in a developing country. *Arch Dis Child.* 1999; 80:171-174.

Chellappan SP, Hiebert S, Mudryj M, Horowitz JM and Nevins Jr. The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein. *Cell.* 1991; 65: 1053–1061.

Chemes, Lucia Beatriz. La protein supresora de tumors retinoblastoma: caracterización de su dominio AB y mecanismo de interacción con La oncoproteína E7 del papilomavirus humano. [Tese]. Buenos Aires: Universidad de Buenos Aires; 2010.

Chen J, Li D, Killary AM, Sen S, Amos CI, Evans DB et al. Polymorphisms of p16, p27, p73, and MDM2 modulate response and survival of pancreatic cancer patients treated with preoperative chemoradiation. *Annals of Surgical Oncolog.* 2009; 16 431–439.

Cheng X-K, Wang X-J, Li X-D, Ren X-Q. Genetic association between the cyclin-dependent kinase inhibitor gene p27/Kip1 polymorphism (rs34330) and cancer susceptibility: a meta-analysis. *Scientific reports.* 2017; 7:44871.

Cho EY, Suh Y-L, Shin H-J. Trilateral retinoblastoma: a case report. *J Korean Med Sci.* 2001; 17:137–140

Chu IM, Hengst L, Slingerland JM. The cdk inhibitor p27 in human cancer: prognostic potential and relevance to anticancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2008; 8(4): 253-67.

ClinVar. Acesso em 29/08/2018. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>

Colombo J e Rahal P. A tecnologia de *microarray* no estudo do câncer de cabeça e pescoço. *Revista brasileira de biociências*.2009; 1679-2343. ISSN 1980-4849.

Conkrite K, Sundby M, Mukai S, Thomson JM, Mu D, Hammond SM et al. miR-17~92 cooperates with RB pathway mutations to -promote retinoblastoma. *Genes Dev*. 2011; 25(16):17341745.

Cowell JK, Smith T, Bia B. Frequent constitucional C to T mutations in CGA-arginine codons in the *RB1* gene produce premature stop codons in patients with bilateral (hereditary) retinoblastoma. *Eur. J Hum Genet*. 1994; 2(4):281-90.

Crosby ME and Almasan A. Opposing Roles of E2Fs in cell proliferation and death. *Cancer Biol Ther*. 2004; 3(12): 1208-1211.

Dahiya A, Gavin MR, Luo RX, Dean DC. Role of the LXCXE binding site in Rb function. *Molecular and Cellular Biology*. 2000; 6799-6805.

De Andrade AFB, Barbosa RH, Vargas FR, Ferman S, Eisenberg AL, Fernandes L et al. A molecular study of first and second *RB1* mutational hits in retinoblastoma patients. *Cancer Genetics and Cytogenetics*.2006; 167: 43-46.

De Baets G, Durme JV, Reumers J, Maurer-Stroh S, Vanhee P, Dopazo J et al. SNPeffect 4.0: on-line prediction of molecular and structural effects of protein-coding variants. *Nucleic Acids Research*. 2012; 40.

De Camargo B, Santos MO, Rebelo MS, Reis RS, Ferman S, Noronha CP et al. Cancer incidence among children and adolescents in Brazil: first report of 14

population-based cancer registries. *International Journal Cancer*. 2010; 126: 715-720.

De Potter P. Current treatment of retinoblastoma. *Current Opinion in Ophthalmology*. 2002; v.13, n.5, p.331-336.

DeGregori J, Leone G, Miron A, Jakoi L, Nevins JR. Distinct roles for E2F proteins in cell growth control and apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997; 94: 7245-7250.

Dehainault C, Michaux D, Pages-Berhouet S, Caux-Moncoutier V, Doz F, Desjardins L et al. A deep intronic mutation in the *RB1* gene leads to intronic sequence exonisation. *European Journal of Human Genetics*. 2007; 15, 473-477.

Dehainault C, Garancher A, Castéra L, Cassoux N, Aerts I, Doz F et al. The survival gene *MED4* explains low penetrance retinoblastoma in patients with large *RB1* deletion. *Hum Mol Genet*. 2014; 23: (19), 5243-5250.

D'Elia G, Grotta S, Bufalo FD, De Loris MA, Surace C, Sirleto P et al. Two novel cases of trilateral retinoblastoma: genetics and review of the literature. *Cancer genetics*. 2013; 206: 398-401.

Devarajan B, Prakash L, Kannan TR, Abraham AA, Kim U, Muthukkaruppan V et al. Targeted next generation sequencing of *RB1* gene for the molecular diagnosis of retinoblastoma. *BMC Cancer*. 2015; 15:320.

Dick FA and Rubin SM. Molecular mechanisms underlying RB protein function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2013; 14(5): 297-306.

Di Fiore R, D'Anneo A, Tesoriere G, Vento R. *RB1* in cancer: different mechanisms of *RB1* inactivation and alterations of pRb pathway in tumorigenesis. *J Cell Physiol*. 2013; 1-46p.

Dimaras H and Corson TW. Retinoblastoma, the visible CNS tumor: a review. *J Neuro Res*. 2017; 1-16.

Dimaras H, Khetan V, Halliday W, Orlic M, Prigoda NL, Piovesan B et al. Loss of *RB1* induces non-proliferative retinoma: increasing genomic instability correlates with progression to retinoblastoma. *Human Molecular Genetics*. 2008; 17(10), 1363-1372.

Dommering CJ, Mol BM, Moll AC, Burton M, Cloos J, Dorsman JC et al. *RB1* mutation spectrum in a comprehensive nationwide cohort of retinoblastoma patients. *J. Med. Genet*. 2014; 51: 366-374.

Dorak T. Real-time PCR. *Bios Advanced Methods*. 2007.

Dyson NJ. *RB1*: a prototype tumor suppressor and an enigma. *Genes & Development*. 2016; 30:1492-1502.

Engeland K. Cell cycle arrest through indirect transcriptional repression by p53: I have a DREAM. *Cell Death and Differentiation*. 2018; 25, 114-132.

Ensemble. Acesso em 28/09/2018. Disponível em <http://www.ensembl.org>

Erichsen HC and Chanock SJ. SNPs in cancer research and treatment. *British Journal of Cancer*. 2004; 90:747-751.

ExAC Browser Beta. Acesso em 28/09/2018. Disponível em <http://exac.broadinstitute.org/>

Fischer M, Uxa S, Stanko C, Magin TM, Engeland K. Human papilloma virus E7 oncoprotein abrogates the p53-p21-DREAM pathway. *Scientific Reports*. 2017; 7: 2603.

François J, De Sutter E, Coppieters R, De Bies S. Late extraocular tumors in retinoblastoma survivors. *Ophtalmologica (Basel)*. 1980; 181:93-99.

Frenkel S, Zloto O, Sagi M, Fraenkel A, Pe'er J. Genotype-Phenotype correlation in the presentation of retinoblastoma among 149 patients. *Experimental Eye Research*. 2016; 146, 313-317.

Galindo CR, Orbach DB, VanderVeen D. Retinoblastoma. *Pediatr Clin N Am*. 2015; 62: 201-223.

Ganguly A, Shields CL. Differential gene expression profile of retinoblastoma compared to normal retina. *Molecular vision*.2010; 16:1292-1303.

Grotta S, D'Elia G, Scavelli R, Genovese S, Surace C, Sirleto P et al. Advantages of a next generation sequencing targeted approach for the molecular diagnosis of retinoblastoma. *BMC Cancer*.2015; 15:841.

Guan X, Wang Y, Xie R, Chen L, Bai J, Lu J et al. p27Kip1 as a prognostic factor in breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *J. Cell. Mol. Med*. 2010; 14(4): 944-953.

Henley SA and Dick FA. The retinoblastoma family of proteins and their regulatory functions in the mammalian cell division cycle. *Cell Division*. 2012; 7:10.

Hermes Pardini, laboratório de diagnostico molecular. Acesso em 13/06/2018. Disponível em <https://www3.hermespardini.com.br/pagina/1169/teste-de-cgh-array-para-diagnostico-de-alteracoes-cromossomicas.aspx>

Hnit SST, Xie C, Yao M, Holst J, Bensoussan A, De Souza P et al. P27kip1 signaling: Transcriptional and post-translational regulation. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2015; 68: 9-14.

Houston SK, Murray TG, Wolfe SQ, Fernandes CE. Current Update on retinoblastoma. *Int. Ophthalmol Clin*. 2011; 51(1): 77-91.

Huang PH, Cook R, Mittnacht S. RB in DNA repair. *Oncotarget*. 2015; 6(25).

Hossain A, Murshid GMM, Zilani MNH et al. *TP53* codon 72 polymorphism and breast cancer risk in Bangladeshi population. *Breast Cancer*. 2017; 24(4), 571–578.

Indovina P, Pentimalli F, Casini N, Vocca I, Giordano A. *RB1* dual role in proliferation and apoptosis: Cell fate control and implications for cancer therapy. *Oncotarget*. 2015; 6(20).

Instituto Oncoguia. Acesso em 26/06/2018. Disponível em: <http://www.oncoguia.org.br/>

Instituto Nacional do câncer (INCA). Estimativa 2018: Incidência do Câncer no Brasil. Acesso em 26/06/2018. Disponível em <http://www.inca.gov.br>.

International Genome – 1000Genomes. Acesso em 28/09/2018. Disponível em <http://www.internationalgenome.org/>

Jiao Y, Jiang Z, Wu Y, Chen X, Xiao X, Yu H. A functional polymorphism (rs937283) in the MDM2 promoter region is associated with poor prognosis of retinoblastoma in Chinese Han population. *Scientific Reports*. 2016; 6: 31240.

Joaquin M, De Nadal E, Posas F. Na RB insensitibe to CDK regulation. *Molecular & Cellular Oncology*. 2017; 4(1), e1268242.

Jong MC, Kors WA, Graaf P, Castelijns JA, Kivela T, Moll AC. Trilateral retinoblastoma: a systemic review and meta-analysis. *Lancet Oncology*. 2014; 15: 1157-67.

Jong MC, Kors WA, Graaf P, Casteli JA, Moll AC, Kivela T. The incidence of trilateral retinoblastoma: a systemic review and meta-analysis. *Am J Ophthalmol*. 2015; 160(6): 1116-1126.

Jurkiewicz E, Pakula-Kosciesza I, Rutynowska O, Nowak K. Trilateral retinoblastoma: an institutional experience and review of the literature. *Childs Nerv Syst*. 2010; 26: 129-132.

Kalsoom S, Wasim M, Afzal S, Shahzad MS, Ramzan S, Awan AR, Anjum AA, Ramzan K. Alterations in the *RB1* gene in Pakistani patients with retinoblastoma using direct sequencing analysis. *Molecular Vision*. 2015; 21: 1085-1092.

Kanber D, Berulava T, Ammerpohl O, Mitter D, Richter J, Siebert R et al. The Human Retinoblastoma Gene is Imprinted. *Plos Genetics*. 2009; 5(12), e1000790.

Kapatai G, Brundler MA, Jenkinson H, Kearns P, Parulekar M, Peet AC et al. Gene expression profiling identifies different sub-types of retinoblastoma. *British Journal of Cancer*. 2013; 109, 512-525.

Kato MV, Shimizu T, Ishizaki K, Kaneko A, Yandell DW, Toguchida J et al. Loss of heterozygosity on chromosome 17 and mutation of the p53 gene in retinoblastoma. *Cancer Letters*. 1996, 75-82.

Khalid MKNM, Yakob Y, YasinR, Teik KW, Siew CG, Rahmat J et al. Spectrum of germ-life *RB1* gene mutations in Malaysian patients with retinoblastoma. *Mol Vision*. 2015; 21:1185-1190.

Kirchhoff M, Bisgaard AM, Stoeva R, Dimitrov B, Kaesbach GG, Fryns JP et al. Phenotype and 244k Array-CGH characterization of chromosome 13q deletions: an update of the phenotypic map of 13q21.1-qter. *Am J Med Genet Part A*. 2009; 149A: 894-905.

Knudsen E and Knudsen K. Tailoring to RB: tumour suppressor status and therapeutic. *Nat Rev Cancer*. 2008; 8(9): 714-724.

Knudson AG. Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma. *Proc Nat AcadSci USA*. 1971; 68(4): 820-823.

Lakatosová M and Holecková B. Fluorescence in situ hybridization. *Biologia, Bratislava*. 2007; 62(3): 243-250.

Landa I, Montero-Conde C, Malanga D, De Gisi S, Pita G, Leandro-Garcia LJ et al. Allelic variant at -79 (C>T) in *CDKN1B* (p27kip1) confers an increased risk of thyroid cancer and alters mRNA levels. *Endocrine-related cancer*. 2010; 17: 317-328.

Lee J and Kim SS. The function of p27KIP1 during tumor development. *Experimental and molecular medicine*. 2009; 41(11): 765-771.

Li G, Sturgis EM, Wang LE, Chamberlain RM, Spitz MR, El-Naggar AK et al. Association between the V109G polymorphism of the p27 gene and the risk and progression of oral squamous cell carcinoma. *Clinical Cancer Research*. 2004; 10, 3996-4002.

Li WL, Buckley J, Lara PAS, Maglente DT, Viduetsky L, Tatarinova TV et al. A rapid and sensitive next-generation sequencing method to detect *RB1* mutations improves care for retinoblastoma patients and their families.

Liban TJ, Medina EM, Tripathi S, Sengupta S, Henry W, Buchler NE et al. Conservation and divergence of C-terminal domain structure in the retinoblastoma protein family. *PNAS*. 2017; 114(9).

Lira RPC, Leôncio MP, Pinho J, Rocha G, Lira PC. Retinoblastoma extra-ocular: um estudo de 37 casos. *Arq. Bras. Oftal*. 1995; 58(6).

Livak KJ and Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*. 2001; 25, 402-408.

Lohmann DR, Gallie BL. Retinoblastoma: revisiting the model prototype of inherited cancer. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2004; 129C(1): 23–8.

Lohmann DR, Brandt B, Hopping W, Passarge E, Horsthemke B. The spectrum of *RB1* germ-line mutations in hereditary retinoblastoma. *Am J Hum Genet*. 1996; 58:940–949.

Lohmann DR, Horsthemke B. No association between the presence of a constitutional *RB1* gene mutation and age in 68 patients with isolated unilateral retinoblastoma. *Eur J Cancer*. 1999; 35: 1035–1036.

Longuini VC, Lourenço Jr DM, Sekiya T, Meirelles O, Goncalves TD, Coutinho FL et al. Association between the p27 rs2066827 variant and tumor multiplicity

in patients harboring *MEN1* germline mutation. *European Journal of Endocrinology*. 2004; 171, 335-342.

Longworth MS, Dyson NJ. pRB, a local chromatin organizer with global possibilities. *Chromosoma*. 2010; 119: 1-11.

Leiden Open Variation Database – LOVD. Acesso em 28/09/2018. Disponível em <http://www.lovd.nl/3.0/home>

Lu Y, Gao K, Zhang M, Zhou A, Zhou X, Guan Z et al. Genetic association between *CDKN1B* rs2066827 polymorphism and susceptibility to cancer. *Medicine*. 2015; 94(46).

Ma H, Jin G, Hu Z, Zhai X, Chen W, Wang S et al. Variant genotypes of *CDKN1A* and *CDKN1B* are associated with an increased risk of breast cancer in Chinese women. *Int. J. Cancer*. 2006; 119, 2173-2178.

Mateu E, Sánchez F, Nájera C, Beneyto M, Castell V, Hernández M et al. Genetics of retinoblastoma: a study. *Cancer Genet Cytogenet*. 1997; 95: 40-50.

Matilainen S, Isohanni P, Euro L, Lönnqvist T, Pihko H, Kivelä T et al. Mitochondrial encephalomyopathy and retinoblastoma explained by compound heterozygosity of *SUCLA2* point mutation and 13q14 deletion. *Eur J Hum Genet*. 2015; 23, 325-330.

McEvoy J, Ulyanov A, Brennan R, Wu G, Pounds S, Zhang J et al. Analysis of MDM2 and MDM4 single nucleotide polymorphisms, mRNA splicing and protein expression in retinoblastoma. *Plos One*. 2012; 7(8), e42739.

McEvoy J, Nagahawatte P, Finkelstein D, Yutz JR, Valentine M, Ma J et al. *RB1* gene inactivation by chromothripsis in human retinoblastoma. *Oncotarget*. 2014; 5(2).

McEvoy JD, Dyer MA. Genetic and Epigenetic discoveries in human retinoblastoma. *Crit Rev Oncog*. 2015; 20(3-4): 217-25.

Meins M, Lehmann J, Gerresheim F et al. Submicroscopic duplication in Xq28 causes increased expression of the *MECP2* gene in a boy with severe mental retardation and features of Rett syndrome. *J Med Genet.* 2005; 42(2): e12.

Miller SA, Dykes DD et al. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *NuclAcid Res.*1988; 3(6): 1215.

Mitter D, Ullmann R, Muradyan A, Klein-Hitpan L, Kanber D, Öunap K et al. Genotype-phenotype correlations in patients with retinoblastoma and interstitial 13q deletions. *Eur J Hum Genet.* 2011; 19: 947-958.

Motegi T, Kaga M, Yanagawa Y, Kadowaki H, Watanabe K, Inoue A et al. A recognizable pattern of the midface of retinoblastoma patients with interstitial deletion of 13q. *Hum Genet.* 1983; 64: 160–162.

Nguyen HH, Nguyen HTT, Vu NP, Le QT, Pham CM, Ma TTH et al. Mutational screening of germline *RB1* gene in Vietnamese patients with retinoblastoma reveals three novel mutations. *Mol Vision.* 2018; 24: 231-238.

Oliveira JS, Ferreira RS, Santos LM, Marin LJ, Corrêa RX, Luizon MR et al. Self-declared ethnicity and genomic ancestry in prostate cancer patients from Brazil. *Genetics and Molecular Research.* 2016; 15(4).

Orjuela MA, Munoz LC, Paul L, Ortiz MAR, Liu X, Chen J et al. Risk of retinoblastoma is associated with a maternal polymorphism in dihydrofolate reductase (*DHFR*) and prenatal folic acid intake. *Cancer.* 2012; 118: 5912-9.

Ortiz MV and Dunkel IJ. Retinoblastoma. *Journal of Child Neurology.* 2016; 31(2): 227-236.

Ottaviani D, Parma D, Giliberto F, Ferrer M, Fandino A, Davila MT, Chantada G, Szijan I. Spectrum of *RB1* mutations in argentine patients: 20-years experience in the molecular diagnosis of retinoblastoma. *Ophthalmic Genet.* 2013; 34 (4): 189-98.

Ottaviani D, Alonso C, Szijan I. Uncommon *RB1* somatic mutations in a unilateral retinoblastoma patient. *Medicine.* 2015; 75: 137-141.

Palazzi MA, Stephan C, Brandalise SR, Aguiar SS. Retinoblastoma diagnosis: a proposal based on the experience of Centro Infantil Boldrini, Brazil. *Pediatr Hematol Oncol* 2013; 30(5): 379-385.

Pandey NA. Retinoblastoma an overview. *Saudi Journal of Ophthalmology*. 2014; 28: 310-315.

Parma D, Ferrer M, Luce L, Giliberto F, Szijan I. RB1 gene mutations in Argentine retinoblastoma patients. Implications for genetic counseling. *Plos One*. 2017; 12(12): e0189736.

Pasquali D, Circelli L, Faggiano A, Pancione M, Renzullo A, Elisei R et al. *CDKN1B* V109G polymorphism a new prognostic factor in sporadic medullary thyroid carcinoma. *European Journal of Endocrinology*. 2011; 164, 397-404.

Pellegata NS. MENX and MEN4. *Clinics*. 2012; 67(s1): 13-18.

Perri F, Pisconti S, Scarpati GDV. P53 mutations and cancer: a tight linkage. *Ann Transl Med*. 2016; 4(24): 522.

Pimentel M, Rebouças CS, Gallo C. *Genética Essencial*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 2013.

Ponchel F, Toomes C, Bransfield K et al. Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: an alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC Biotechnol*. 2003; 3: 18.

Popovic MB, Diezi M, Kuchler H, Abouzeid H, Maeder P, Balmer A et al. Trilateral retinoblastoma with suprasellar tumor and associated pineal cyst. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2007; 29 (1).

Price EA, Price K, Kolkiewicz K, Hack S, Reddy MA, Hungerford JL et al. Spectrum of *RB1* mutations identified in 403 retinoblastoma patients. *J Med Genet.* 2014; 51: 208-214.

Rao R, Honavar SG. Retinoblastoma. *Indian J Pediatr.* 2017.

Reis AHO, Carvalho INSR, Damasceno PBS, Ferman SE, Lucena E, Camelo JSL et al. Influence of MDM2 and MDM4 on development and survival in hereditary retinoblastoma. *Pediatr Blood Cancer.* 2012; 59: 39-43.

Reis AHO, Vargas FR, Lemos B. More epigenetic hits than meets the eye: microRNAs and genes associated with the tumorigenesis of retinoblastoma. *Frontiers in genetics.* 2012; 3.

Risch NJ. Searching for genetic determinants in the new millennium. *Nature.* 2000; 405, n.6788, 847-856.

Rushlow DE, Mol BM, Kennett JY, Yee S, Pajovic S, Theriault BL et al. Characterisation of retinoblastomas without *RB1* mutations: genomic, gene expression, and clinical studies. *Lancet.* 2013; 14: 327-34.

Sampieri K, Mencarelli MA, Epistolato MC, Toti P, Lazzi S, Bruttini M et al. Genomic differences between retinoma and retinoblastoma. *Acta Oncologia.* 2008; 47: 1483-1492.

Scollon S, Anglin AK, Thomas M, Turner JT, Schneider KW. A comprehensive review of pediatric tumors and associated cancer predisposition syndromes. *J Genet Counsel.* 2017; 26: 387-434.

Selistre SGA, Maestri MK, Santos-Silva P, Schüller LF, Guimarães LSP, Giacomazzi J et al. Retinoblastoma in a pediatric oncology reference center in Southern Brazil. *BMC Pediatrics.* 2016; 16:48.

Sellers WR and Kaelin Jr WG. Role of the retinoblastoma protein in the pathogenesis of human cancer. *J Clin Oncol.* 1997; 15: 3301-3312.

Sena PP. Diagnóstico molecular de mutações no gene *RB1* em pacientes com retinoblastoma e seus familiares: implicações para o aconselhamento genético. [Dissertação]. Rio de Janeiro: Instituto Nacional do Câncer; 2013.

Sharifzadeh M, Ghassemi F, Amoli FA, Rahmanikhah E, Tabatabaie SZ. Retinoblastoma in Adults: a case report and literature review. *J Ophthalmic Vis Res.* 2014; 9(3): 388-391.

Shields CL, Schoenberg E, Kocher K, Shukla SY, Kaliki S, Shields JA. Lesions simulating retinoblastoma (pseudoretinoblastoma) in 604 cases. *Ophthalmology.* 2013; 120: 311-316.

Singh J, Mishra A, Pandian AJ, Mallapatna AC, Khetan V, Sripriya S et al. Next-generation sequencing-based method shows increased mutation detection sensitivity in an Indian retinoblastoma cohort. *Molecular Vision.* 2016; 22: 1036-1047.

Sivakumaran TA, Shen P, Wall DP, Do BH, Kucheria K, Oefner PJ. Conservation of the *RB1* gene in human and primates. *Human Mutations.* 2005; 25: 396-409.

Sociedade Brasileira de Pediatria. Acesso em 26/06/2018. Disponível em <http://www.sbp.com.br/>

Stofanko M, Dornelas HG, Cunha OS, Pena HB, Morgante AMV, Pena SDJ. Simple, rapid and inexpensive quantitative fluorescent PCR method for detection of microdeletion and microduplication syndromes. *Plos One.* 2013; 8(4), e61328.

Thomas DM, Carty SA, Piscopo DM, Lee JS, Wang WF, Forrester WC, Hinds PW. The retinoblastoma protein acts as a transcriptional coactivator required for osteogenic differentiation. *Molecular Cell.* 2001; 8: 303-316.

Toguchida J, McGee TL, Paterson JC, Eagle JR, Tucker S, Yandell DW et al. Complete genomic sequence of the human retinoblastoma susceptibility gene. *Genomics.* 1993; 17: 535-543.

Tonelli F, Guidici F, Giusti F, Marini F, Cianferotti L, Nesi G et al. A heterozygous frameshift mutation in exon 1 of *CDKN1B* gene in a patient

affected by MEN4 syndrome. *European Journal of Endocrinology*. 2014; 171, K7-K17.

Uchida C. Roles of pRB in the regulation of nucleosome and chromatin structures. *BioMed Research International*. 2016.

Varley KE and Mitra RD. Nested Patch PCR enables highly multiplexed mutation discovery in candidate genes. *Genome Research*. 2008; 18: 1844-1850.

Vélez-Cruz R and Johnson DG. The retinoblastoma (RB) tumor suppressor: pushing back against genome instability on multiple fronts. *Internacional Journal of Molecular Sciences*. 2017; 18, 1776.

Vervoorts J and Lüscher B. Post-translational regulation of the tumor suppressor p27KIP1. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2008; 65: 3255-3264.

Wander SA, Zhao D, Slingerland JM. P27: a barometer of signaling deregulation and potential predictor of response to targeted therapies. *Clin Cancer Res*. 2011; 17(1).

Wei F, Xu J, Tang L, Shao J, Wang Y, Chen L et al. p27KIP1 V109G polymorphism and cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*. 2012; 27(10).

Xiang H, Li H, Ge W, Wu W, Gao M, Wang W et al. Association of *CDKN1B* gene polymorphisms with susceptibility to breast cancer: a meta-analysis. *Mol Biol Rep*. 2013; 40: 6371-6377.

Xu XL, Fang Y, Lee TC, Forrest D, Evans CG, Almeida D et al. Retinoblastoma has properties of a cone precursor tumor and depends upon cone-specific MDM2 signaling. *Cell*. 2009. 137, 1018-1031.

Yee AS, Reichel R, Kovessi I, Nevins JR. Promoter interaction of the E1A-inducible factor E2F and its potential role in the formation of a multi-component complex. *EMBO J*. 1987; 6 (7), 2061-2068.

9 Apêndices

9.1 TCLE (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Prezado voluntário(a) você está sendo convidado(a) a participar do trabalho de pesquisa que tem como título:

IDENTIFICAÇÃO E VALIDAÇÃO DAS DELEÇÕES NA REGIÃO CROMOSSÔMICA 13q14 POR PCR EM TEMPO REAL E CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA DOS GENES *RB1* E *CDKN1B* EM PACIENTES COM RETINOBLASTOMA

Nome do voluntário: _____ Idade: _____

Gênero: () Masculino () Feminino

O retinoblastoma é um tumor câncer ocular infantil, que tem frequência relativamente baixa na população e seu aparecimento ocorre até os cinco anos de idade. Este tumor pode se manifestar em um ou nos dois olhos e diferentemente de outros tipos de câncer, uma parte significativa dos retinoblastoma é hereditária, ou seja, possui herança familiar. Alterações no gene *RB1*, região localizada no DNA que é frequentemente responsável pelo desenvolvimento do retinoblastoma, são os principais fatores genéticos que causam o retinoblastoma, mas

recentemente tem sido sugerido que outros genes possam estar envolvidos no desenvolvimento do tumor, tais como *MDM2*, *MDM4*, *CDKN1A*, *CDKN1B* e *NMYC*. As análises genéticas do DNA possibilita a identificação de indivíduos com maior risco para o desenvolvimento de retinoblastoma. Desta forma, poderá ser realizado um acompanhamento das famílias visando a detecção precoce de alterações oculares.

O paciente ou indivíduo sem a doença está sendo convidado (a) a participar, de um estudo clínico que envolve a análise genética de parte do sangue coletado.

Para que você, ou responsável do menor, possa decidir se quer participar ou não deste estudo, precisa conhecer seus benefícios, riscos e implicações.

OBJETIVO DO ESTUDO

Pesquisar alterações em regiões localizadas no DNA, tais como o gene *RB1* ou na região onde este gene se localiza e genes relacionados, tais como *MDM2*, *MDM4* e *NMYC*, *CDKN1A*, *CDKN1B*, em amostras de tumor e sangue de pacientes com retinoblastoma e indivíduos não portadores da doença.

PROCEDIMENTOS DO ESTUDO

Se for autorizada a participação do paciente no estudo, será coletada uma amostra de sangue (3 a 5 mL, ou menos, dependendo da idade do participante) utilizando material estéril e descartável para ser analisado exclusivamente neste estudo.

RISCOS

O seu tratamento será exclusivamente o mesmo caso o paciente participe ou não deste estudo. A coleta de sangue para a pesquisa coincidirá com a coleta do sangue para os exames rotineiros, de forma a não ser prevista punção venosa adicional, sempre no horário e data estabelecida pelo médico responsável pelo tratamento do paciente. Somente em raros casos, poderá ser necessária uma nova coleta de sangue, que será avisada com antecedência e mediante autorização e aceite do participante/responsável. A coleta de sangue, que é parte de seu tratamento regular, pode gerar um pequeno desconforto local durante a punção ou o surgimento de manchas roxas transitórias chamadas de equimoses devido à punção. Para minimizar os possíveis incômodos, a coleta de sangue poderá ser substituído por amostra de saliva, realizada com um coletor oral que causa menos desconforto ao paciente.

BENEFÍCIOS

Os benefícios esperados são o acompanhamento das famílias visando à detecção precoce de alterações oculares e o aconselhamento genético destas famílias. Além disso, a análise genética será de grande importância para a correlação com o desenvolvimento do tumor, possibilitando, no futuro, novas estratégias de tratamento.

ACOMPANHAMENTO, ASSISTÊNCIA E RESPONSÁVEIS

Será oferecido suporte dos profissionais do grupo de aconselhamento genético a todas as famílias dos indivíduos estudados, que terão a oportunidade de optar pelas condutas preventivas. Quaisquer dúvidas podem ser esclarecidas com o pesquisador e médico responsável pelo serviço de aconselhamento genético, Dr. Fernando Regla Vargas através do telefone (21) 3865-8141.

Caso não deseje participar desta pesquisa, os exames solicitados por seu médico agora e no futuro serão realizados normalmente.

CARÁTER CONFIDENCIAL DOS REGISTROS

Além da equipe de saúde que cuidará do paciente, os registros médicos poderão ser consultados pelo Comitê de ética da Fundação Oswaldo Cruz e equipe de pesquisadores envolvidos. O nome do paciente não será revelado ainda que informações de seu registro médico sejam utilizados para propósitos educativos ou de publicação de caráter científico, que ocorrerão independentemente dos resultados obtidos.

TRATAMENTO MÉDICO EM CASOS DE DANOS

Todo e qualquer dano decorrente do desenvolvimento deste projeto de pesquisa, e que necessite de atendimento médico, ficará a cargo da instituição. Seu tratamento e acompanhamento médico independem de sua participação neste estudo.

CUSTOS

Não haverá qualquer custo ou forma de pagamento ao paciente/responsável pela sua participação no estudo.

BASES DA PARTICIPAÇÃO

É importante que o paciente/responsável saiba que a participação do paciente neste estudo é completamente voluntária e que você pode recusar-se a participar ou interromper sua participação a qualquer momento sem penalidades ou perda de benefícios aos tratamentos que o paciente tem direito. Em caso de você decidir interromper sua participação no estudo, a equipe assistente deverá ser comunicada e a coleta de amostras para os exames relativos ao estudo científico serão imediatamente interrompidos.

GARANTIA DE ESCLARECIMENTO

A equipe de pesquisadores envolvidos no estudo convida e incentiva aos pacientes/responsáveis e seus familiares a fazerem perguntas a qualquer momento do estudo. Neste caso, podem contactar o pesquisador e médico responsável pelo serviço de aconselhamento genético, Dr. Fernando Regla Vargas no telefone (21) 3865-8141. Além disso, todo o projeto científico é encaminhado para o Comitê de Ética em Pesquisa da Fiocruz (CEP Fiocruz) que analisa e avalia projetos de pesquisa envolvendo seres humanos, a fim de garantir que as pesquisas atendam aos fundamentos éticos, científicos e ao cumprimento das Resoluções do Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP). Para informações e dúvidas, contactar pelo telefone: (21) 3882-9000 (ramal 9011).

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO E ASSINATURA

Li as informações acima e entendi o propósito deste estudo assim como os benefícios e riscos potenciais da participação no mesmo. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas foram respondidas. Eu, por intermédio deste, dou livremente meu consentimento para participar neste estudo.

Entendo que poderei ser submetido a exames de sangue adicionais necessários ao meu tratamento e não receberei nenhum tipo de compensação monetária por minha participação neste estudo.

Tal documento apresenta-se em duas vias de igual valor, onde uma se destinará ao participante da pesquisa e outra ficará com o pesquisador, e declaro que recebi uma cópia assinada deste formulário de consentimento.

_____ / ____ / _____

(Assinatura do paciente ou responsável) dia mês ano

(Nome do paciente ou responsável em letra de forma)

_____ / ____ / _____

(Assinatura de testemunha, se necessário) dia mês ano

Eu, abaixo assinado, expliquei completamente os detalhes relevantes deste estudo ao paciente ou seu responsável indicado acima para consentir pelo paciente.

_____, ____ / ____ / _____

(Assinatura da pessoa que obteve o consentimento) dia mês ano

9.2 Aprovação do comitê de ética para o desenvolvimento da pesquisa

Carta de aprovação



Rio de Janeiro, 13 de agosto de 2008.

Dr. Hélio M. Sznajder Abreu,
Coordenador de Estado

Referência ao Protocolo 49/08: "Estudo Científico em
Reintrodução".

Prezado Doutor

O COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA do Instituto Nacional de Câncer,
em sessão de 10 de julho de 2008, aprovou o estudo intitulado: Protocolo 49/08 -
"Estudo Científico em Reintrodução", sob o termo de Consentimento Livre e
Esclarecido.

Enxerto encaminhado e Acumulado por escrito ao CONET, com o termo
de assentimento.

De acordo com o fluxo de aprovação de estudos éticos vigentes, o
protocolo em anexo será devolvido para que seja encaminhado por V.S. a Comissão de
Assessoria para procedimentos quanto ao Conselho de Fomento.

Assinatura
Dr. Lúcia Helena Oliveira
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa
INCA

9.3 Genotipagem dos pacientes com retinoblastoma para o polimorfismo rs2066827

ID	LAT	posição 402 V109G rs2066827 T>G	
ID57	U	TT	HOMOZIGOSE NORMAL
ID146 /38	UMF	TT	HOMOZIGOTO
ID153	U	TT	HOMOZIGOTO
HSM6	B	TG	HETEROZIGOTO
HSM7	B	TG	HETEROZIGOTO
HSM8	U	TT	HOMOZIGOTO
HSM9	B	TG	HETEROZIGOSE
HSM10	U	TG	HETEROZIGOSE
HSM11	U	TT	HOMOZIGOSE NORMAL
HSM17	U	TG	HETEROZIGOSE
HSM20	B	TG	HETEROZIGOTO
HSM21	U	GG	HOMOZIGOTO
HSM22	U	TT	HOMOZIGOTO
HSM23	B	TT	HOMOZIGOSE NORMAL
HSM24	B	TT	HOMOZIGOSE NORMAL
HSM25	U	TG	HETEROZIGOTO
HSM28	B	TT	HOMOZIGOTO
ID1	U	GG	HOMOZIGOTO
ID4	-	TT	HOMOZIGOTO
ID6	U	TT	HOMOZIGOSE NORMAL
ID7	-	TT	HOMOZIGOSE NORMAL
F01	U	TT	HOMOZIGOTO
ID125	-	TT	HOMOZIGOTO
ID128	U	TT	HOMOZIGOTO
ID131	B	TG	HETEROZIGOTO
ID134	U	TG	HETEROZIGOTO
ID20	U	TT	HOMOZIGOTO
ID127	B	TT	HOMOZIGOTO NORMAL
ID132	U	TT	HOMOZIGOTO
G85/15	-	TT	HOMOZIGOTO
G44/17	U	TT	HOMOZIGOTO NORMAL
G22/16 ID77	B	TT	HOMOZIGOTO
G40/17 ID71	U	TG	HETEROZIGOSE
G24/16	U	TT	HOMOZIGOTO
ID129	B	TG	HETEROZIGOSE
ID135	U	TT	HOMOZIGOSE
ID188	U	TG	HETEROZIGOSE

ID187	U	TG	HETEROZIGOSE
ID162	U	GG	HOMOZIGOTO
ID185	U	TT	HOMOZIGOSE
ID183	U	TG	HETEROZIGOSE
ID181	U	TT	HOMOZIGOSE
ID180	U	TG	HETEROZGOSE
ID178	U	TG	HETEROZGOSE
ID174	U	GG	HOMOZIGOSE/
ID167	U	TG	HETEROZGOSE
ID154	B	TT	HOMOZIGOSE
ID148	B	GG	HOMOZIGOTO
ID152	B	TG	HETEROZIGOSE
ID150	B	GG	HOMOZIGOTO
ID149	B	GG	HOMOZIGOTO
ID145	U	TT	HOMOZIGOSE
ID140	U	TG	HETEROZIGOSE
ID138	U	TT	HOMOZIGOSE
ID137	U	TG	HETEROZIGOSE
ID186	U	TG	HETEROZIGOSE
ID135	U	GG	HOMOZIGOTO
ID132	B	GG	HOMOZIGOTO
ID121	B	GG	HOMOZIGOTO
ID95	B	TT	HOMOZIGOSE
ID81	U	TT	HOMOZIGOSE
ID68	U	TT	HOMOZIGOSE
ID151	U	TT	HOMOZIGOSE
ID117	U	GG	HOMOZIGOTO
ID113	U	TT	HOMOZIGOSE
ID139	UMF	GG	HOMOZIGOTO
ID110	B	TG	HETEROZIGOSE
ID66	U	GG	HOMOZIGOTO
ID*86	U	TT	HOMOZIGOTO
ID*89	B	TT	HOMOZIGOTO
ID*63	U	GG	HOMOZIGOTO
ID*64	U	TT	HOMOZIGOSE

9.4 Genotipagem de grupo controle para o polimorfismo rs2066827

ID	genotipagem	sexo
239	GG	F
145	TT	F
173	GG	F
227	TT	F
189	GG	F
207	TG	F
219	TT	F
277	TT	F
193	TT	F
161	GG	F
255	TG	F
223	TT	F
185	TT	F
M	TT	M
275	TG	F
105	GG	F
233	GG	F
201	GG	F
217	TG	F
237	TT	F
235	TG	F
251	TG	F
281	TG	F
291	TT	F
279	TG	F
187	TT	F
273	TT	F
209	TT	F
149	TT	F
253	TG	F
267	TT	F
263	TG	F

171	TT	F
283	TT	F
289	TT	F
91	TG	F
125	TG	F
127	TT	F
129	TG	F
259	TT	F
257	TT	F
157	GG	F
205	TT	F
247	GG	F
181	TT	F
159	TG	F
241	GG	F
243	TG	F
175	TG	F
177	GG	F
155	TG	F
229	TG	F
167	TG	F
215	TT	F
285	TT	F
225	TG	F
265	TG	F
269	TG	F
197	TT	F
131	TG	F
271	TG	F
203	TT	F
151	GG	F
249	TG	F
191	TT	F
261	TT	F
179	TG	F
245	TG	F
123	TG	F
213	TG	F

231	GG	F
195	TG	F
153	TG	F
221	TG	F
199	TG	F
106 - LHG	TT	F
117 - LGH	TG	F
118 - LGH	TG	M
6 - LGH	TT	M
25 - LGH	TG	F
29 - LGH	GG	F
34 - LGH	TT	F
69 - LGH	TT	M
70 - LGH	TT	F
71 - LGH	TT	M
72 - LGH	GG	M
73 - LGH	TT	F
75 - LGH	GG	F
76 - LGH	TG	F
77 - LGH	TG	M
80 - LGH	TG	M
81 - LGH	TG	F
82 - LGH	TT	M
83 - LGH	TG	M
84 - LGH	TT	F
89 - LGH	TT	M
90 - LGH	TT	F
91 - LGH	TG	F
92 - LGH	TG	M
133 - LGH	TT	F
134 - LGH	TG	M
135 - LGH	TT	M
137 - LGH	TG	F
156 - LGH	TG	F
157 - LGH	TG	M
162 - LGH	TT	M
165 - LGH	TT	M
166 - LGH	TG	M

167 - LGH	TG	M
168 - LGH	TG	M
169 - LGH	TG	M
170 - LGH	TG	M
171 - LGH	TT	M
172 - LGH	GG	M
173 - LGH	TG	F
174 - LGH	GG	F
175 - LGH	TG	M
176 - LGH	TT	M
177 - LGH	TG	F
179 - LGH	TT	M
180 - LGH	TG	M
181 - LGH	TT	F
183 - LGH	TG	M
184 - LGH	GG	M
185 - LGH	TG	M
186 - LGH	TG	M
187 - LGH	TT	M
190 - LGH	TT	M
142 - LGH	TG	M
143 - LGH	TT	M
144 - LGH	TG	M
145 - LGH	TT	M
146 - LGH	TT	F
149 - LGH	TG	M

9.5 Revisão de literatura dos casos de retinoblastoma com deleção no gene *RB1* e região 13q14

Referência	Casos	Sexo		Idade ao diagn. (meses)	Lateralidade			Deleção	
		M	F		U	B	T	Comp.	Parcial
Devarajan et al., 2015	1		+	33		+		+	
	2		+	0		+			E4-6
	3		+	31		+			E24-25
	4		+	39		+			E10-12
	subtotal	0	4		0	4	0	1	3
Dommering et al., 2014	1		+	NI	+			+	
	2		+		+			+	
	3	+				+		+	
	4	+			+			+	
	5		+		+			+	
	6		+		+			+	
	7	+				+		+	
	8	+				+		+	
	9	+				+		+	
	10	+				+		+	
	11	+				+		+	
	12		+			+		+	
	subtotal	7	5		5	7	0	12	0
Grotta et al., 2015	1		+	NI			+	+	
	2		+			+			E1
	3		+			+			E17
	4	+				+			E3-6
	5		+			+			E7
	6	+			+			+	
	7	+			+			+	
	8	+			+			+	
	9	+			+			+	

	10	+			+			+	
	subtotal	6	4		5	4	1	6	4
He et al., 2014	1		+	1		+		+	
	2	+		9		+		+	
	3	+		12		+		+	
	4	+		16		+		+	
	5		+	8		+		+	
	6		+	5		+			E13-16
	7		+	2		+			E7-17
	8		+	2		+			E7-9
	subtotal	3	5		0	8	0	5	3
Houdayer et al., 2014	1	NI		NI		+		+	
	2					+		+	
	3					+		+	
	4					+		+	
	5					+		+	
	6				+			+	
	7					+			P-E6
	8					+			P-E2
	9					+			P-E2
	10					+			E2
	11					+			E3
	12					+			E3
	13					+			E8
	14					+			E18-27
	15					+			E19-20
	16					+			E24-27
	17					+			P-E17
	18					+			P-E17

	subtotal				1	17	0	6	12
Khalid et al., 2015	1		+			+		+	
	2		+	10	NI	+			P-E3
	3		+	27	+			+	
	subtotal	0	3		1	2	0	2	1
Li et al., 2016	1	NI		NI		+			P-E17
	2					+		+	
	3					+		+	
	4					+		+	
	subtotal				0	4	0	3	1
Nguyen et al., 2018	1		+	NI		+		+	
	2	+				+		+	
	3	+				+		+	
	4		+			+		+	
	5		+			+		+	
	6		+			+			E4-27
	subtotal	2	4		0	6	0	5	1
Ottaviani et al., 2013	1	NI		12		+			E1-17
	2			18		+		+	
	3			30	+			+	
	4			11		+		+	
	5			18		+			E18-27
	6			3	+			+	
	7			48	+			+	
	8			2	+			+	
	subtotal				4	4	0	6	2
Richter et al., 2003	1	NI		NI		+		+	
	2					+		+	
	3					+		+	

	4					+		+		
	5					+		+		
	6					+		+		
	7					+		+		
	8					+		+		
	9					+		+		
	10					+		+		
	11					+		+		
	12					+		+		
	13					+		+		
	14					+		+		
	15					+		+		
	16					+		+		
	17					+			E18-27	
	18					+			P-E2	
	19					+			P-E2	
	20					+			E17	
	21					+			E17	
	22					+			E17	
	23					+			P-E17	
	24					+			E13	
	25					+			E13	
	subtotal					5	20	0	16	9
Singh et al., 2016	1	NI		NI		+				E8-11
	2					+				E24-27
	3					+				E25
	4					+				E25-27
	5					+		+		
	subtotal					1	4	0	1	4

Nosso estudo, 2018	1		+	8		+			E10-11
	2	+		10		+			E18-27
	3	+		5		+			E1-7
	4		+	4		+			P-E1
	5		+	8		+		+	
	6		+	NI	+			+	
	7	+		20	+			+	
	8	+		12		+		+	
	9		+	17		+		+	
	subtotal	4	5		2	7	0	5	4
	total	22	30		24	87	1	68	44

NI: não informado

Referência	Casos	Sexo		Idade ao diagn. (meses)	Lateralidade			Deleção Parcial
		M	F		U	B	T	
Devarajan et al., 2015	1		+	0		+		E4-6
	2		+	31		+		E24-25
	3		+	39		+		E10-12
Grotta et al., 2015	1		+			+		E1
	2		+			+		E17
	3	+				+		E3-6
	4		+			+		E7
He et al., 2014	1			5		+		E13-16
	2			2		+		E7-17
	3			2		+		E7-9
Houdayer et al., 2014	1			NI		+		P-E6
	2					+		P-E2
	3					+		P-E2

	4					+		E2
	5					+		E2
	6					+		E3
	7					+		E8
	8					+		E18-27
	9					+		E19-20
	10					+		E24-27
	11					+		P-E17
	12					+		P-E17
Khalid et al., 201	1		+	10		+		P-E3
Li et al., 2016	1			NI		+		P-E17
Nguyen et al., 2018	1		+	NI		+		E4-27
Ottaviani et al., 2013	1			12		+		E1-17
	2			18		+		E18-27
Richter et al., 2003	1			NI		+		E18-27
	2					+		P-E2
	3					+		P-E2
	4					+		E17
	5					+		E17
	6					+		E17
	7					+		P-E17
	8					+		E13
	9					+		E13
Singh et al., 2016	1		+			+		E8-11
	2	NI				+		E24-27
	3	+				+		E25
	4		+			+		E25-27
Nosso estudo, 2018	1		+	8		+		E10-11
	2	+		10		+		E18-27

	3	+		5		+		E1-7
	4		+	4		+		P-E1
Total	44	4	12	-	1	43	0	-

NI: não informado

Referência	Casos	Sexo		Idade ao diagn. (meses)	Lateralidade			Deleção Completa
		M	F		U	B	T	
Devarajan et al., 2015	1		+	33		+		+
Dommering et al., 2014	1		+	NI	+			+
	2		+		+			+
	3	+				+		+
	4	+			+			+
	5		+		+			+
	6		+		+			+
	7	+				+		+
	8	+				+		+
	9	+				+		+
	10	+				+		+
	11	+				+		+
	12		+			+		+
Grotta et al., .2015	1		+	NI			+	+
	2	+			+			+
	3	+			+			+
	4	+			+			+
	5	+			+			+
	6	+			+			+

He et al., 2014	1		+	NI		+		+
	2	+				+		+
	3	+				+		+
	4	+				+		+
	5		+			+		+
Houdayer et al., 2014	1	NI		NI		+		+
	2					+		+
	3					+		+
	4					+		+
	5					+		+
	6				+			+
Khalid et al., 2015	1		+	NI		+		+
	2		+		+			+
Li et al., 2016	1	NI		NI		+		+
	2					+		+
	3					+		+
Nguyen et al., 2018	1		+	NI		+		+
	2	+				+		+
	3	+				+		+
	4		+			+		+
	5		+			+		+
Ottaviani et al., 2013	1	NI		18		+		+
	2			30	+			+
	3			11		+		+
	4			3	+			+
	5			48	+			+
	6			2	+			+
Richter et al., 2003	1	NI		NI		+		+
	2					+		+

	3					+		+
	4					+		+
	5					+		+
	6					+		+
	7					+		+
	8					+		+
	9					+		+
	10					+		+
	11					+		+
	12				+			+
	13				+			+
	14				+			+
	15				+			+
	16				+			+
Singh et al., 2016	1		+			+		+
	2		+			NI		+
Nosso trabalho, 2018	1		+	8		+		+
	2		+	NI	+			+
	3	+		20	+			+
	4	+		12		+		+
	5			17		+		+
Total	68	19	19	-	23	45	1	-

NI: não informado

9.6 Artigo publicado

Med Oncol (2016)33:49
DOI 10.1007/s12032-016-0766-4



REVIEW ARTICLE

Translating microRNAs into biomarkers: What is new for pediatric cancer?

Ivna Néria Silva Ribamar de Carvalho^{1,2} · Renata Mendes de Freitas² · Fernando Regla Vargas^{1,2,3}

Received: 4 April 2016 / Accepted: 11 April 2016
© Springer Science+Business Media New York 2016

Abstract Since their discovery in 2008, cell-free circulating microRNAs have been considered potential biomarkers for various conditions, including pediatric cancer. Diagnosis of pediatric cancer still relies on clinical signs, which sometimes may be non-specific or appear at later stages. Thus, there is a need for a better understanding of molecules that allow a less invasive, early and effective method of cancer diagnosis. Despite the efforts of many researchers to set specific miRNAs to be routinely used as diagnostic molecules, no miR has been currently utilized so far. In this study, we review the recent discoveries on circulating miRNAs in blood of patients suffering from the following pediatric cancers: osteosarcoma, rhabdomyosarcoma, Wilms tumor, acute myeloid leukemia, acute lymphocytic leukemia, retinoblastoma and neuroblastoma. We also focus on the roles of circulating miRs in tumorigenesis pathways, the methodological approaches used to detect and quantify circulating miRs, and discuss the challenges in using them routinely as biomarkers for pediatric cancers.

Keywords Circulating microRNAs · Pediatric cancer · Biomarkers · Exosomal miR

✉ Fernando Regla Vargas
fernando.vargas@ioc.fiocruz.br

¹ Genetics Department, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

² Birth Defects Epidemiology Laboratory, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Av Brasil 4365, Rio de Janeiro, RJ 21040-360, Brazil

³ Genetics and Molecular Department, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

Published online: 10 April 2016

Springer

Introduction

Pediatric cancer comprises a series of complex diseases, which corresponds to 2–3 % of all malignancies. Although it is considered rare when compared to adult cancers, pediatric cancer represents a major cause of death related to diseases in children and adolescents. During the past decades, significant advances have been accomplished in survival of patients, as a reflection of improved diagnostic and therapeutic approaches. However, the diagnosis of cancer still depends on the onset of symptoms, which may become apparent at advanced stages. Hence, there is a need to uncover novel biomarkers in blood, in order to develop less invasive and cheaper methods to diagnose pre-symptomatic cancers.

miRNAs are tiny molecules that regulate gene expression in a post-transcriptional way. Researchers have found that cancer cells are able to secrete miRNAs in blood circulation, which can be detected and quantified. In the present study, we have reviewed the role of microRNAs as putative tools for diagnosis in six pediatric cancers: osteosarcoma, rhabdomyosarcoma, Wilms tumor, leukemia (acute myeloid and acute lymphocytic), retinoblastoma and neuroblastoma. We have also analyzed the advantages and disadvantages of the different methodologies used for measuring circulating miRs in patients with these tumors.

microRNA: biogenesis and function

In 1993, it was described the identification of the first microRNA, lin-4, that was found to be essential for larval development in *Caenorhabditis elegans*. The progression from the first larval stage to the second larval stage was dependent on the down-regulation of lin-14 protein which