

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**TRICOEPITELIOMA MÚLTIPLO FAMILIAR: DELINEAMENTO FENOTÍPICO E  
GENOTÍPICO**

Anderson Pontes Arruda

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências (Genética e Biologia Molecular)

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra Lavínia Schüler-Faccini

Porto Alegre

Março de 2016

Esse trabalho é parte do Instituto Nacional de Genética Médica Populacional (INaGeMP) e foi realizado no Laboratório de Genética Médica e Evolução do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Dedico essa tese à minha família  
em especial à minha mãe que em  
todos os momentos esteve ao meu  
lado me apoiando.

## Agradecimentos

Este trabalho contou com a participação e apoio de várias pessoas com as quais sou grato.

Agradeço à professora doutora Lavínia Schüller-Faccini pela orientação e apoio durante este trabalho, sem os quais eu não teria concretizado os objetivos pretendidos.

Agradeço especialmente à Doutora Erlane Marque Ribeiro que me apresentou aos pacientes e que em todas as etapas desse trabalho esteve sempre ao meu lado.

Agradeço aos colegas de laboratório por todos os momentos de amizade, pelo auxílio na bancada e na troca contínua de conhecimento. Um grande abraço a Thayne Woycink Kowalski, Mariléia Furtado Freire, Bibiane Armiliato de Godoy. Meus agradecimentos ao colega Juliano Boquett pelo auxílio na busca de artigos e pela constante amizade.

Um abraço especial aos funcionários Elmo Cardoso do PPGBM e Célio Luiz Rafaelli do INAGEMMP por todo o apoio e compreensão.

Aos colegas Augusto César Cardoso dos Santos e a Jéssica Oyie pelo auxílio com as coletas de DNA e assinatura dos TCLE dos pacientes.

Agradeço ao dermatologista Dr. Leonardo Augusto Coelho Torres da Silva pelo auxílio com as biópsias e análises anatomopatológicas dos pacientes.

À minha família, pai Moisés (*in memoriam*), mãe Aparecida, irmã Vanusa e família por sempre me apoiarem nas horas mais difíceis.

Sumario	
Lista de abreviaturas.....	6
Lista de tabelas.....	7
Lista de figuras.....	8
Resumo.....	9
Abstract.....	10
Introdução.....	11
Objetivos.....	26
Gerais.....	26
Especificos.....	26
Material e métodos.....	27
Resultados.....	32
Discussão.....	37
Perspectivas futuras.....	41
Conclusão.....	41
Anexos.....	42
Referencias bibliográficas.....	50

## Lista de Abreviaturas

aCGH – Array Comparative Genome Hybridization  
BSS – Brooke-Spiegler Syndrome  
CBC – Carcinoma Basocelular  
CD34 - Cluster of Differentiation 34  
CF – Cilindromatose Familiar  
CYLD – Gene da Cilindromatose  
DNA – Ácido Desoxiribonucleico  
DUB - Lys63-deubiquitinante  
EAC – Epitelioma Adenoide Cístico  
GEMEPO - Genética Médica Populacional  
HDAC6 - Histona desacetilase 6  
IFNA17 - Interferon Alfa 17  
IKK - IkappaB cinase  
IL-1 - Interleucina 1  
INAGEMP – Instituto Nacional de Genética Médica Populacional  
INCT - Institutos Nacionais de Ciência e Tecnologia  
JNK – c-Jun N-terminal kinases  
kDa – kilo Dalton  
MAC - Carcinoma microcístico anexial  
MAF - Frequência do alelo menor  
NFKB – Fator de Necrose Kappa Beta  
OMIM - Online Mendelian Inheritance in Man  
P62 - Ubiquitin-binding protein p62  
PCR – Reação em cadeia da Polimerase  
PHLDA1 - Pleckstrin homology-like domain family A member 1  
PIK3CA - Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha  
PolyPhen2 - Polymorphism Phenotyping-2  
PTCH - Pached  
RUV - Radiação ultravioleta  
SIFT – Sorting Intolerant From Tolerant  
SQSTM1 – Sequestossomo 1  
STRING - Known and Predicted Protein-Protein Interactions  
TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido  
TDAG51 - Proteína do gene 51 de células T associada a morte celular  
TE - Tricoepitelioma  
TEs - Tricoepiteliomas  
TMF – Tricoepitelioma Multiplo Familiar  
TRAF6 - Receptor do Fator de Necrose Tumoral associado ao fator 6  
UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

## Lista de tabelas

Tabela 1 Principais mutações descritas na literatura.....	18
Tabela 2 Primers utilizados para amplificação dos fragmentos.....	30
Tabela 3 Polimorfismos descritos no exoma.....	36

## Lista de figuras

- Figura 1. Mutações do gene *CYLD* identificadas até o momento.....17
- Figura 2. Foto de 18 dos 20 familiares afetados que participaram do estudo molecular.....33
- Figura 3. Foto dos 6 familiares normais que participaram do estudo molecular....33

## RESUMO

O Tricoepitelioma Múltiplo Familiar (TMF) é uma genodermatose de herança autossômica dominante que apresenta características em comum com a Cilindromatose Familiar e a síndrome de Brooke-Spiegler por apresentarem aparecimento de tumores benignos originários de anexos da pele com predileção de aparecimento na região do nariz no início e final da adolescência, mas progredindo em tamanho e número à medida que entram na idade adulta. O Tricoepitelioma pode ser esporádico ou familiar e solitário ou múltiplo. Há vários casos já relatados na literatura da forma familiar e múltiplo, porém, nenhuma grande família relatada no Brasil. A maioria das mutações encontradas nos pacientes são da linha germinativa do gene *CYLD*. Relatamos uma grande família Brasileira com vários afetados com Tricoepitelioma Múltiplo Familiar. Após investigarmos, os principais genes relatados na literatura por várias técnicas moleculares como sequenciamento por Sanger e exoma não encontramos a mutação causativa dessa família. Expectamos ainda a avaliação desses pacientes por Hibridização Genômica Comparativa por Array (aCGH) afim de investigarmos se não houve alguma grande deleção do cromossomo 16 onde está localizado o gene *CYLD*, deleção essa que não pode ser detectada pelos exames já utilizados.

## ABSTRACT

The Multiple Familial Trichoepithelioma (MFT) is a genodermatosis autosomal dominant inheritance which has features in common with the Family Cilindromatose and Brooke-Spiegler syndrome because they have the appearance of benign tumors originating from skin appendages with the appearance of predilection in the nose region beginning in early and late adolescence, but progressing in size and number as they enter adulthood. The Trichoepithelioma can be sporadic or familial and solitary or multiple. There are several cases already reported in the family and multiple from literature, however, no great family reported in Brazil. Most mutations found in patients are the germ of *CYLD* gene line. We report a large Brazilian family with several affected with Multiple Familial Trichoepithelioma. After investigating the key genes reported in the literature by various molecular techniques as sequencing by Sanger and exoma not find the causative mutation of this family. Still we expectance the evaluation of these patients by Array Comparative Genome Hybridization (aCGH) in order to investigate if there was not any large deletion of chromosome 16 is located where the *CYLD* gene deletion that can not be detected by tests already used

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. TRICOEPITELIOMA MÚLTIPLO FAMILIAR, CILINDROMATOSE FAMILIAR, SÍNDROME DE BROOKE-SPIEGLER**

O tricoepitelioma múltiplo familiar (TMF), a cilindromatose familiar (CF) e a síndrome de Brooke-Spiegler (BSS) são doenças genéticas, autossômicas dominantes, que apresentam características clínicas em comum. Todas se caracterizam pelo aparecimento de tumores benignos originários de anexos da pele com início no final da adolescência, mas progredindo em tamanho e número à medida que entram na idade adulta (JOHNSON et al., 2008).

O tricoepitelioma múltiplo familiar (TMF), também chamado de epitelioma adenóide cístico (EAC), é uma dermatose autossômica dominante, caracterizada pela presença de múltiplos tumores de pele predominantemente na face. O exame histológico mostra agregados dérmicos de células basalóides com conexão ou diferenciação para folículos capilares (SALHI et al., 2004; ZHANG, 2004; WU et al., 2014). É considerada uma variação fenotípica da BSS no qual os pacientes apresentam apenas tricoepiteliomas (GUARDOLI et al., 2015; VANECEK et al., 2014). Indivíduos com TMF apresentam frequentemente desfiguração, pois os tricoepiteliomas tendem a crescer em tamanho e número ao longo do tempo e contribuir para os desafios psicossociais. A presença de carcinoma basocelular é mais frequente nestas pessoas (JOHNSON et al., 2008).

A cilindromatose familiar (CF), também de herança autossômica dominante, se caracteriza por nódulos eritematosos múltiplos que aparecem no escalpo (cilindromas), mas também na fronte ou mesmo na área pubiana. Múltiplos cilindromas podem coalescer formando placas, ocasionando a perda de cabelo quando ocorrem no escalpo (TRUFANT et al., 2012)

Em 1961, Guggenheim relatou que o tricoepitelioma (TE) pode ocorrer em uma família ou mesmo em um paciente, juntamente com cilindroma e postulou uma condição genética única. Isso tem sido corroborado por vários relatos

mostrando a coexistência destas duas patologias e, ocasionalmente, espiroadenomas. Esta é a síndrome de Brooke-Spiegler (BSS) em alusão aos primeiros autores que descreveram o tricoepitelioma (Brooke) e cilindroma (Spiegler) (MIM 605041). Assim, propôs-se que esta síndrome ocorreria por defeitos na regulação da proliferação e diferenciação de células-tronco pontuais da unidade folículo-apócrino dando origem a diferentes tumores de pele e seus anexos, bem como a outras neoplasias. (SALHI et al., 2004). A síndrome de Brooke-Spiegler é uma doença rara, de herança autossômica dominante e caracterizada pelo desenvolvimento de múltiplas neoplasias cutâneas de anexos, incluindo espiroadenomas (de glândulas sudoríparas), cilindromas (diferenciação écrina e apócrina), tricoepiteliomas (de folículos capilares) (GROSSMANN et al., 2013; GUARDOLI et al., 2015; VANECEK et al., 2014). Adenocarcinomas de células basais das glândulas parótidas e maiores e menores neoplasmas de glândulas salivares também são encontradas na BSS (PONTI et al., 2012; GUARDOLI et al., 2015; VANECEK et al., 2014) Esses neoplasmas anexiais cutâneos infreqüentemente sofrem transformação maligna. Neoplasmas morfológicamente similares podem surgir em glândulas salivares e excepcionalmente na mama (VANECEK et al., 2014).

Em 1996, Harada et al. relataram ligação de TMF autossômico dominante à região cromossômica 9p21 (HARADA et al, 1996). Por outro lado, mutações em um gene supressor de tumor localizado no cromossomo 16, *CYLD*, foram documentadas como causadores da cilindromatose familiar. Mutações em *CYLD* foram também detectadas em famílias chinesas com TMF. Como algumas famílias com mutações em *CYLD* foram afetadas ambas com cilindromas e TEs, sugeriu-se que este gene seria o responsável pela síndrome de Brooke-Spiegler (FENSKE et al. 2000).

Na verdade, é possível que TMF, CF e BSS sejam formas alélicas com expressões clínicas distintas (SALHI et al., 2004). No entanto, ainda permanece a questão de saber se TMF sem cilindroma associado representa uma entidade genética separada, ligada ao cromossomo 9p21 (MIM 612099), ou se pode também se originar de mutações no gene *CYLD* (SALHI et al., 2004)

## 1.2 TMF e gene *CYLD*

O gene *CYLD* é composto de 20 exons, dos quais os três primeiros são não traduzidos (GenBank NM\_015247), e se estende por aproximadamente 56 kb do DNA genômico. *CYLD* tem três variantes de processamento principais (PONTI et al., 2012). Este gene codifica a proteína *CYLD* de 120 kDa (GenBank NP\_056062), conservada evolutivamente, pertencente a uma família de enzimas deubiquitinas. Desempenha papel chave na regulação negativa do NFκB e da via de sinalização JNK (PONTI et al., 2012; GROSSMANN et al., 2013; VANECEK et al., 2014). *CYLD* é amplamente expresso e regula uma variedade de funções celulares, incluindo a inflamação e a proliferação celular (PONTI et al., 2012). A inibição do *CYLD* aumenta a resistência à apoptose levando a uma proliferação descontrolada das células (GUARDOLI et al., 2015).

Várias mutações germinativas no gene *CYLD* têm sido encontradas em BSS/MFT, envolvendo principalmente as sequências codificantes e os sítios de junções éxon-íntron entre os éxons, especialmente nas regiões que codificam os domínios enzimáticos entre os éxons 9 a 20. Raramente, grandes deleções germinativas podem ocorrer (VANECEK et al., 2014). A Tabela 1 apresenta as principais mutações descritas na literatura até o momento e que também descrevemos resumidamente nos parágrafos a seguir.

Em 2000, Bignell et al. (BIGNELL et al, 2000) relataram as primeiras mutações no gene *CYLD* causando CF. Todas as mutações estão localizadas em 3' nos dois terços da sequência codificante de *CYLD*. A perda de heterozigose do alelo selvagem do gene *CYLD* sugeriu que é um gene supressor de tumor.

Em 2004, Salhi et al. descreveram uma grande família de origem argelina, com 21 indivíduos afetados com TEs múltiplos em quatro gerações consecutivas. Todos esses pacientes apresentaram características clínicas e histopatológicas típicas de TE envolvendo a face e, em alguns pacientes também o couro cabeludo. Tumores sugerindo o diagnóstico de cilindroma, espiradenoma, ou CBC

estavam ausentes. Foi identificada mutação germinativa no gene supressor de tumor *CYLD* no cromossomo 16q12-q13 segregando com TMF nos membros afetados desta família. Tendo em vista a evidencia anterior para a região 9p21, estes resultados sugerem a heterogeneidade genética da TMF (SALHI et al., 2004).

Liang et al. (2005) relataram duas grandes famílias chinesas não aparentadas com TMF. A idade de início variou do nascimento aos 30 anos. Cilindromas não foram identificados em nenhuma das famílias. Estes autores identificaram duas novas mutações genéticas em *CYLD* dando origem à TMF. Eles lançaram a hipótese de que a mutação germinativa pode ser tecido-específica ou influenciar o tipo de tecido em que ocorre o segundo evento mutacional, necessário para o desenvolvimento de tumor. Quando o segundo evento ocorre em células apócrinas, estas se tornam suscetíveis à cilindromatose, porém quando a mutação ocorre em células foliculares de cabelo os pacientes exibem suscetibilidade ao tricoepitelioma.

Gutierrez e seus colaboradores detectaram uma mutação *frameshift* no gene *CYLD*, designada 2253delG, e mostraram que uma única mutação pode induzir a co-ocorrência de cilindromas e tricoepiteliomas (POBLETE GUTIERREZ et al., 2002).

Young et al. (2006) descreveram uma família com membros afetados exibindo tanto o fenótipo de cilindroma familiar como o tricoepitelioma múltiplo familiar, os quais foram encontrados associados a uma mutação *missense* no gene *CYLD*.

Grossmann et al. (2013) realizaram um estudo de mutações somáticas e germinativas novas e recorrentes em um estudo de coorte de 67 pacientes de 48 famílias com síndrome de Brooke-Spiegler incluindo variações fenotípicas de TMF correlacionando com os achados histológicos em 379 biópsias de pacientes com e sem mutações germinativas de *CYLD*. Neste estudo, conseguiram ampliar o espectro de mutações conhecidas em pacientes com BSS/TMF para 86 mutações em *CYLD* e documentaram a variabilidade de mutações somáticas nesses

pacientes, mas não conseguiram estabelecer correlações genótipo-fenótipo claras.

Ponti et al (2012) investigaram dois indivíduos com BSS através da análise molecular das regiões que flanqueiam os éxons dos genes *CYLD* e *Patched* (*PTCH*) e não detectaram mutação germinativa ou somática. Eles sugerem que outros genes devem estar envolvidos e que mais estudos devem ser realizados procurando mutações novas germinativas (PONTI et al., 2012).

Em 2012, foi relatado um paciente com síndrome de Brooke-Spiegler (BSS) com uma nova mutação no gene *CYLD* (uma inserção de cinco bases interrompendo a matriz de leitura, resultando num códon de terminação prematuro). Uma característica incomum foi a presença de carcinoma basocelular (CBC), em contiguidade com um dos tricoepiteliomas. (MELLY, LAWTON & RAJAN, 2012).

Wu et al (2014) encontraram, através do sequenciamento direto do gene *CYLD* em uma família chinesa com TMF, uma nova mutação *frameshift* também introduzindo um códon de terminação prematuro no éxon 10.

Zhao et al (2014) estudaram uma família chinesa de três gerações com TMF, incluindo três mulheres afetadas e dois homens não afetados. O probando era uma menina de 4 anos de idade, nasceu na sequência de uma gravidez normal. Com a idade de dois anos, ela começou a desenvolver numerosas pápulas da cor da pele firme, em forma de cúpula, que variam em tamanho de 1 a 3 mm de diâmetro, na zona central da face. Foi estudado Foi realizado o sequenciamento dos produtos da PCR dos 17 éxons funcionais do gene *CYLD*. Não ocorreram alterações na região codificadora do *CYLD* e nem nas regiões de flanqueiam os sítios de *splicing* do gene. Casos de mutação germinativas negativa no gene *CYLD* também foram descritas por outros estudos. A frequência de mutações de ponto positiva do *CYLD* em pacientes com TMF é de 44-72%. Isto provavelmente ocorre devido a mutações subjacentes em regiões não codificantes (íntrons, 3'UTR e 5' UTR), rearranjos de fragmentos ou deleções cromossômicas. Ainda não é claro se a função anormal de outros genes também

pode ser a causa da TMF, tal como relatado no lócus do cromossomo 9p21. O sequenciamento por Exoma pode ser feito para identificar alterações em outras regiões ou nucleotídeos nesta família (ZHAO et.al., 2014).

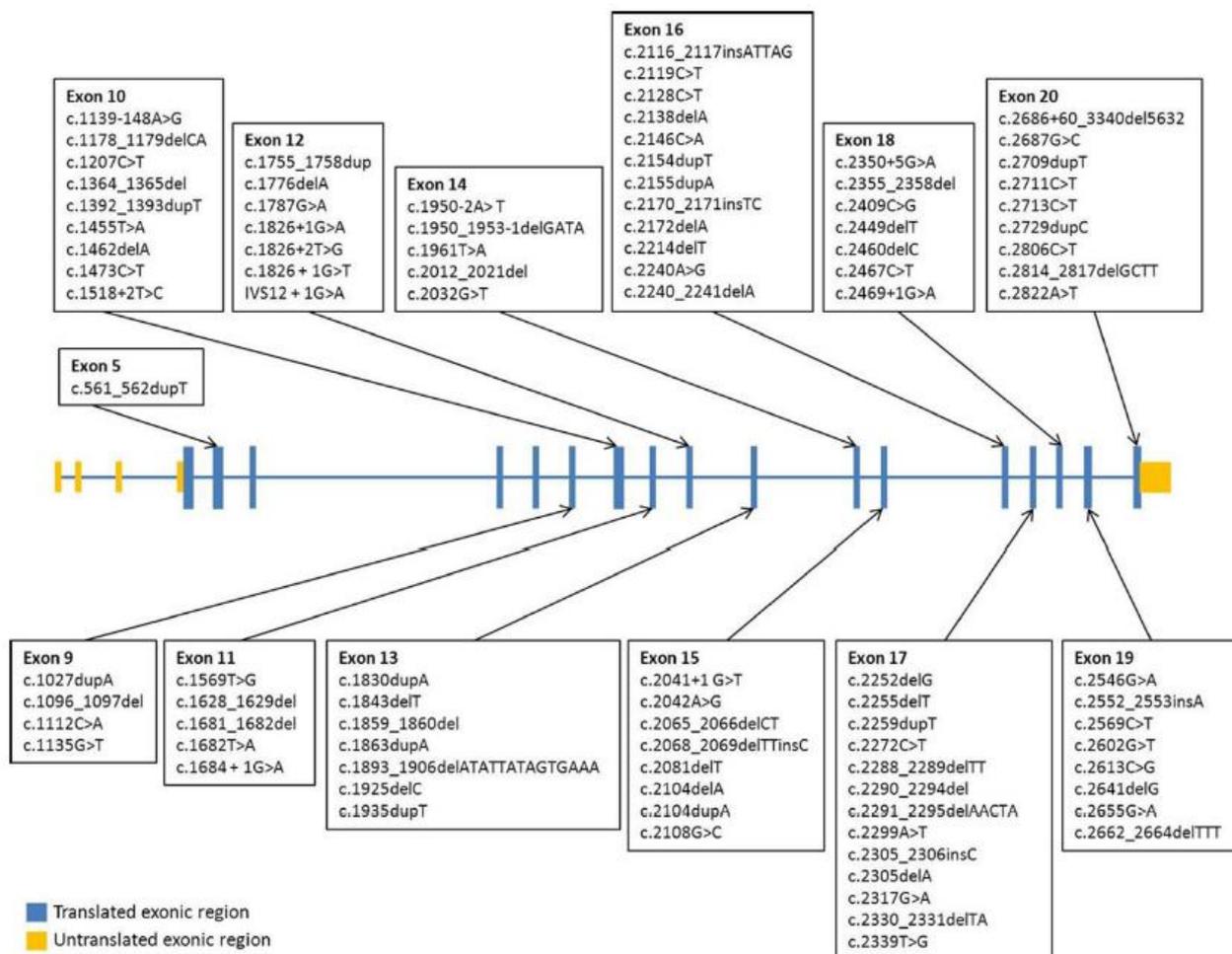
Várias possibilidades foram sugeridas para explicar a ausência de uma mutação *CYLD* detectável, incluindo a presença de um grande rearranjo (deleção, duplicação, e outros), a metilação do promotor, à regulação incorrecta sobre o nível de expressão, e embora isso seja menos provável uma mutação em outro gene. Vanecek e colaboradores (2014) realizaram um estudo para confirmar ou excluir a possibilidade de grandes rearranjos genômicos em região do gene *CYLD* em pacientes com BSS / TMF, sem uma alteração de sequência detectável do gene, usando uma hibridação genômica comparativa por array (aCGH) de alta resolução no cromossomo 16. A análise revelou uma grande deleção nos 2 casos. No caso do paciente com TMF, uma mutação c.914-6398\_1769del13642ins20 (g.50802679\_50816320del13642ins20) foi encontrado. Esta deleção começa no íntron 6, termina no éxon 12, do gene *CYLD* e é acompanhado por uma pequena inserção de 20 pb de origem desconhecida. Este estudo identificou 2 novos grandes rearranjos germinativos, mutações que incluem uma deleção pura e uma deleção / inserção em um coorte de BSS / MFT. Demonstraram que grandes rearranjos são relativamente raros nestes pacientes. Outros mecanismos patogênicos em BSS / MFT, incluindo alterações da sequência da linhagem germinativa, ou grandes rearranjos no gene *CYLD*, devem ser esclarecidas (VANECEK et.al., 2014).

Uma nova mutação germinativa no éxon 15 do gene *CYLD* (c.2070delT/p.F690FfsX3) causa a deleção de um nucleotídeo e resulta num códon de terminação prematuro da tradução no aminoácido 693 antes de quatro pares de bases Cys-X-X-Cys (entre os aminoácidos 788 e 889) e um dos dois dominios catalíticos (entre os aminoácidos 871 e 889) da ubiquitina carboxilase terminal hidrolase (UCH) (GUARDOLI et al., 2015).

Nagy et. al. (2015) catalogou um total de 95 mutações diferentes causadoras de doenças que foram publicadas até o momento para o gene *CYLD*. Um resumo das mutações identificadas em pacientes húngaros e uma revisão da

anteriormente publicadas mutações são apresentados nesta atualização. A maioria das mutações são do tipo: *frameshift* (48%), *nonsense* (27%), *missense* (12%) e *splice-site* (11%). No entanto, duas deleções *inframe* foram também relatadas. A maioria das mutações estão localizadas entre os éxons 9 e 20. (figura 1)

Os dados acima indicam que *CYLD* é um gene pleiotrópico e que mutações podem induzir vários fenótipos diferentes. Por outro lado, heterogeneidade genética também não pode ser descartada pois genes ainda não identificados, como, por exemplo, na região 9p21 poderiam levar igualmente ao TMF (ZHANG, 2004).



**Figura 1. Mutações do gene *CYLD* identificadas até o momento**

Fonte: NAGY et. al., 2015

**Tabela 1. Mutações descritas na literatura no gene CYLD associadas ao Tricoepitelioma**

Autor/ Ano	Pais	n	Tipo de Mutação	Gene	Exon
Lv, 2014	China	6	*Nonsense (1112C>A)	CYLD	9
Li, 2014	China	8	Missense (1112C>A)	CYLD	9
Linos, 2011	Europa	3 fam.	Nonsense (1112C>A/p.S371X)	CYLD	9
Liang, 2008	China	4	Nonsense (1364_1365 del AA)	CYLD	10
Zheng, 2004	China	3 fam.	*Frameshift (c.1462delA)	CYLD	10
Wu, 2014	China	16	*Frameshift (c.1169-1170delCA)	CYLD	10
Ying, 2012	China	4	*Frameshift (c.1178-1179delCA)	CYLD	10
Zuo, 2007	China	5	Missense (1787G>A)	CYLD	11
Chen, 2011	China	4	*Frameshift (c.1925delC)	CYLD	11
Liang, 2005	China	12	Splice (1862+2T>G)	CYLD	12
Huang, 2009	Taiwan	3	Splice (IVS12+1G>A)	CYLD	12
Reuven, 2013	Israel	3	*Frameshift (c.1843delT)	CYLD	13
Salhi, 2004	Algeria	13 fam.	*Frameshift (c.2104-2105insA)	CYLD	15
Almeida, 2008	Suíça	4	Missense (c.2433A>G)	CYLD	15
Guardoli, 2015	Italia		*Frameshift (c.270delT)	CYLD	15
Liang, 2005	China	12	Nonsense (c.2241-2241delAG)	CYLD	16
Melly, 2012	Inglaterra	1	Nonsense (c.2116-2117insATTAG)	CYLD	16
Young, 2006	EUA	3	Missense (c.2806C >T)	CYLD	16
Zheng, 2004	China	3 fam.	*Nonsense (c.2128C>T)	CYLD	17
Wang, 2010	China	4	Missense (c.2317G->A)	CYLD	17
Bowen, 2005	Italia	2 fam.	Nonsense (c.2339T>G)	CYLD	17
Lv, 2014	China	3	*Frameshift (c.22255delT)	CYLD	17
Lv, 2014	China	4	*Nonsense (c.2299A>T)	CYLD	17
Chen, 2011	China	3	*Nonsense (c.2128C >T)	CYLD	17
Zhang, 2004	China	7	Frameshift (c.2355-2358delCAGA)	CYLD	18
Liang, 2008	China	4	Nonsense (c.2409G>C)	CYLD	18
Espana, 2007	Espanha	4	Missense (c.2687G>C)	CYLD	20
Lv, 2008	China	4	Missense (c.2711C> T)	CYLD	20
Zheng, 2004	China	3 fam.	Missense (c.2822A>T)	CYLD	20
Qian, 2014	China	2	Frameshift (c.2815delC)	CYLD	20
Vanecek, 2014	Russia	1	Deleção (-34111_297858del378779) CGH	CYLD	Todos

\* Mutação induzindo stop-códon

### 1.3 A rede de interações do CYLD

Considerando a possível heterogeneidade de loci no TMF, apresentamos a seguir os principais genes envolvidos na rede de interações do CYLD e que

podem estar implicados na patogênese de TMF e/ou CBC, seja como genes principais ou como modificadores de fenótipo.

### 1.3.1 *SQSTM1* e *CYLD*

O gene *SQSTM1* (Sequestossomo 1; também conhecido como p62) codifica uma proteína adaptadora que regula uma variedade de processos biológicos, incluindo sinalização de *NFKB1* (Fator nuclear kappa de luz potenciador de gene polipeptídeo em células B 1), apoptose, regulação da transcrição e autofagia mediada por ubiquitina. O NFKB é um regulador de transcrição que é ativado por vários estímulos intra- e extra-celulares, tais como as citocinas, os radicais livres-oxidantes, irradiação ultravioleta, e produtos bacterianos ou virais. *SQSTM1* contém 8 éxons em um segmento genômico de 16 kb mapeados na região cromossômica cromossomo 5q35 (REA et. al., 2014).

O *SQSTM1* é um parceiro de interação da proteína C quinase atípica e serve como suporte para a sinalização celular e ligação da ubiquitina, que é crítico para várias funções celulares *in vivo* como osteoclastogênese, adipogênese, e ativação de células T. Wooten e colaboradores (2008) demonstraram que a interação *SQSTM1* com *TRAF6* (Receptor do Fator de Necrose Tumoral associado ao fator 6) regula a síntese de cadeias Lys63 em substratos alvo, como *TrkA*. O *TRAF6* funciona como um transdutor de sinal na via de NF-kappaB que ativa IkappaB cinase (IKK), em resposta a citocinas pró-inflamatórias. Esse estudo demonstrou que a interação entre *TRAF6*, Lys63-deubiquitinante (*DUB*) e *CYLD* específico também são regulados pelo adaptador *SQSTM1*. A interação de *CYLD* com *TRAF6* é dependente de *SQSTM1*, definindo, assim, um mecanismo que explica a diminuição da atividade de *CYLD* na ausência de *SQSTM1*. Estes resultados revelam que a *SQSTM1* serve como um adaptador para a formação deste complexo, regulando assim a atividade de *DUB* e *CYLD* por interação *TRAF6* (WOOTEN et.al,2008).

MyD88 é uma molécula adaptadora essencial para os receptores como o Toll (TLRs) e interleucina 1 (IL-1). Um estudo revelou que o silenciamento dos genes *SQSTM1* e *HDAC6* (Histona desacetilase 6) foram necessários para a

agregação MyD88. A proteína HDAC6 possui atividade de desacetilase de histona e reprime a transcrição. A repressão de *SQSTM1* e *HDAC6* aumenta a formação do complexo de MyD88-TRAF6 e reciprocamente diminui a interação do regulador negativo específico CYLD-ubiquitina com o complexo. (INTO et.al, 2010).

#### **1.4 PTCH**

Existem casos de tricoepitelioma esporádicos, nos quais estruturas remanescentes de carcinoma basocelular (CBC) podem ser encontradas. Baseando-se em uma série de TEs esporádicos com perdas de heterozigosidade na região 9q22.3, onde está mapeado o gene supressor de tumor *PTCH1*, Matt *et al.* (2000) postularam um mecanismo comum para ambas condições, tanto tricoepitelioma como CBC. Suas observações corroboram um relato anterior que observa que TE esporádicos contem mutações somáticas no gene *PTCH1* superexpresso, sugerindo uma falha no mecanismo de feedback negativo na rota sonic hedgehog-patched (SALHI et al., 2004). A análise do gene *PTCH1* no cromossomo 9q22.3, mostra mutações encontradas em tricoblastomas e tricoepiteliomas. Mutações no gene *PTCH1* são a causa subjacente da síndrome do carcinoma basocelular nevíde e são também encontrados em diversos tumores esporádicos onde este gene pode agir como um supressor de tumor (PONTI et al., 2012).

#### **1.5 IFNA17**

O gene Interferon Alfa 17 (*IFNA17*) produz a proteína de mesmo nome que é responsável por interferir na replicação de vírus, bactérias e células tumorais e estimular a atividade de defesa de outras células. Produzida pelos leucócitos e fibroblastos existem três tipos de interferon, classificados de acordo com o receptor celular e resposta que ativam. É um tipo de citocina produzida por todos os animais vertebrados e alguns invertebrados. A forma *alfa* é produzida por leucócitos quando invadidos por vírus é classificada como tipo I. Induz a

própria célula infectada e células próximas a produzirem proteínas que impedem a replicação do vírus. Usado para tratar hepatite B, hepatite C e esclerose múltipla. Sua produção é estimulada por interleucina 1 e 2 e pelo Fator de necrose tumoral. (HALLER, KOCHS & WEBER, 2007).

## **1.6 *PIK3CA***

O gene *PIK3CA* foi mapeado na região cromossômica 3q26.3 por Volinia et al. (1994) através da análise de híbridos de células somáticas por hibridação in situ fluorescência (FISH) (VOLINIA et. al., 1994)

*PIK3CA* é um gene de 34 kb composto por 20 éxons que codificam 1.068 aminoácidos originando uma proteína de 124 kDa de tamanho. O primeiro dos levantamentos mutacionais foi publicado por Samuels et al (2004). Amplificações gênicas, deleções e mais recentemente mutações missense somática no gene *PIK3CA* têm sido relatados em muitos tipos de cânceres humanos incluindo cânceres de cólon, mama, cérebro, fígado, estômago e de pulmão. Estas mutações missense somáticas provavelmente aumentam a atividade de *PIK3CA* quinase contribuindo para a transformação celular (KARAKAS, BACHMAN & PARK, 2006).

Samuels et al. (2004) concluíram que as mutações em *PIK3CA* geralmente surgem no final da tumorigenese, pouco antes ou ao mesmo tempo com a invasão. Mutações em *PIK3CA* também foram identificadas em 4 de 15 glioblastomas (27%), de 12 cânceres gástricos (25%), 1 de 12 cânceres da mama (8%), e 1 de 24 cânceres do pulmão (4%). Nenhuma mutação foi observada em 11 cânceres de pâncreas ou 12 meduloblastomas. No total, foram observadas 92 mutações, todas as quais foram determinadas como sendo somáticas nos cânceres que podem ser avaliadas, sugerindo que este gene é funcionalmente importante.

## 1.7 Complicações, patologias associadas e dificuldades diagnósticas do TE

Carcinoma basocelular (CBC) de pele é a neoplasia mais comum em humanos. Estudos prévios mostram um desbalanço (perda de heterozigidade e instabilidade de microssatélites) em CBC em vários cromossomos humanos incluindo a região 9p21-p22. Para esta região do cromossomo 9 a frequência global de perda de heterozigidade foi de até 55% (SARIDAKI, 2000). Exposição a radiação ultravioleta (RUV) é o principal fator de risco associado a gênese do CBC, o que se evidencia pela maior ocorrência em áreas expostas a luz solar, pelas frequências populacionais relacionadas a latitude, por associações com doenças genéticas com fotossensibilidade e por padrões de exposição solar entre os pacientes. Há também maior incidência de CBC em africanos albinos do que em negros. O risco atribuível a radiação solar para as neoplasias malignas queratinocíticas pode atingir até 90% (CHINEM, 2011).

Tricoepitelioma desmoplásico representa uma neoplasia anexial considerada benigna, caracterizada por conspícua diferenciação folicular. Em contraste com a configuração típica de tricoepitelioma nodular convencional, o tricoepitelioma desmoplásico apresenta microscopicamente muitos cordões finos de células germinativas foliculares incorporadas no estroma esclerótico amplo (ALMEIDA et. al., 2001). Não é inesperado que haja sobreposição significativa entre o espectro de tricoepitelioma desmoplásico e carcinoma basocelular uma vez que ambos apresentam diferenciação folicular. Excepcionalmente, um tricoepitelioma pode mimetizar ou ser mal interpretado como carcinoma de células escamosas. Como ambos, carcinoma microcístico anexial (MAC) e tricoepitelioma desmoplásico, incluem focos microcísticas, bem como cordões de células anexiais enredados em estroma esclerosado, pode haver sobreposição arquitetônica entre as duas entidades (McCALMONT & HUMBERSON, 2012).

Carcinoma Tricoblastico é um tumor maligno cutâneo raro derivado das células germinativas foliculares. Os tumores surgem na face, couro cabeludo e extremidades. Discute-se se o carcinoma tricoblastico desenvolve-se *de novo* ou é devido à degeneração maligna de um tumor preexistente benigno, tal como um tricoepitelioma ou tricoblastoma. O diagnóstico diferencial clínico e histológico

inclui carcinoma basocelular com diferenciação matricial, carcinoma de células escamosas, carcinoma pilomatricial, carcinoma triquilemal, e cilindroma maligno (KIRBY, LUCKING & BILLINGSLEY, 2012).

A observação de fenômenos como CBC em desenvolvimento no contexto de múltiplos tricoepiteliomas, a ocorrência simultânea de tricoepitelioma e CBC esporadicamente, e tricoepitelioma com mutação em *PTCH* que evoluem para CBC com irradiação ultravioleta em camundongos, sugerem que tricoepiteliomas raramente podem progredir para CBC. Além disso, casos raros que apresentam características tanto de CBC como de tricoblastoma sugerem que as duas neoplasias podem existir em um espectro (YEH, MCCALMONT & LEBOIT, 2012).

A diferenciação histopatológica entre tricoepitelioma e carcinoma basocelular (CBC) às vezes pode ser um desafio. Ambos CBC e tricoblastoma, dos quais muitos consideram tricoepitelioma como uma variante, mostram alterações que sugerem diferenciação folicular germinativa. Um estudo recente demonstrou a utilidade de coloração imunohistoquímica para presença de *PHLDA1* no diagnóstico diferencial de tricoepitelioma desmoplásico e CBC morfeico em biópsias superficiais (também conhecido como proteína do gene 51 de células T associada a morte celular, ou TDAG51). Porém a imunopositividade *PHLDA1* não fornece sensibilidade e especificidade precisas para a distinção de CBC e tricoepitelioma. É mais útil no diagnóstico diferencial entre CBC morfeico e tricoepitelioma desmoplásico. A expressão de *PHLDA1* deve ser interpretada cuidadosamente em conjunto com os atributos convencionais histomorfológicos de um determinado tumor (YEH, MCCALMONT & LEBOIT, 2012). O tricoepitelioma é histologicamente semelhante ao carcinoma basocelular, e, embora benigno, carrega um risco raro transformação maligna. A positividade CD34 das células estromais em torno do ninho favorece o aparecimento do Tricoepitelioma. A coloração imunohistoquímica pode ser útil às vezes na diferenciação entre tricoepitelioma e carcinoma. Além disso, os tricoepiteliomas muitas vezes apresentam organismos papilares-mesenquimais, granulomas, e calcificação, enquanto o carcinoma basocelular tem maior probabilidade de

apresentar inflamação, retração, uma maior frequência de células em apoptose, e figuras mitóticas (MOHAMMADI et. Al, 2014).

Apesar de incomum há relatos de CBC em pacientes com TMF (CHINEM, 2011). A concomitância de tricoepiteliomas múltiplos e epiteloma basocelular é bastante rara. (AZULAY, 2001). As neoplasias malignas têm sido relatadas em associação com TMF e outras condições associadas ao gene *CYLD*, tais como a síndrome Brooke-Spiegler. O carcinoma tricoblastico é um tumor raro, mas já foi relatado em associação com estas síndromes em três casos distintos. Em todos havia mutação no gene *CYLD* (KIRBY, LUCKING & BILLINGSLEY, 2012).

### **1.8 Tratamento do TMF**

O Tratamento da TMF depende de uma variedade de técnicas de ablação com resultados variáveis e com risco de cicatrizes. O relato da melhoria clínica com minimização do aparecimento das lesões foi demonstrado após vários tratamentos que utilizam a energia de alta pulsação ou lasers de onda contínua de dióxido de carbono. Outros métodos destrutivos, que incluem crioterapia, dermoabrasão, electrodissecção, radiação e curetagem, têm sido utilizados com resultados modestos (JOHNSON et al., 2008). O tratamento para o carcinoma tricoblastico muitas vezes é cirúrgico. Estes tumores podem ser localmente invasivos e tem um risco de recorrência. Nos casos de pequeno tamanho, aparência patológica circunscrita e baixo grau histológico, pode-se usar a curetagem como uma opção terapêutica segura e eficaz (KIRBY, LUCKING & BILLINGSLEY, 2012; MOHAMMADI et. al., 2014).

A escolha adequada de tratamento de acordo com a profundidade das lesões é crucial. A análise da profundidade das lesões de pele é importante na gestão de tais lesões, e alguns pacientes podem necessitar enxerto de pele após a excisão das lesões. Um estudo brasileiro de vários tipos de tumores cutâneos descreveu o uso de imiquimod creme 5% tópico em tricoepiteliomas para 32 semanas (ALESSI et.al., 2009). Tricoepiteliomas que foram tratados com imiquimod e ácido retinóico apresentaram clareamento em 80%. (MOHAMMADI et. Al, 2014).

Estudos genéticos futuros podem também fornecer uma base sólida para o desenvolvimento de novas terapias que serão mais específicas e eficazes do que os tratamentos sintomáticos atualmente disponíveis para pacientes com TMF, FC, BSS. Recente investigação identificou o lestaurtinib, uma pequena molécula inibidora de TRK como uma nova modalidade terapêutica promissora para os doentes que sofrem de sintomas causados por mutações na linhagem germinativa de *CYLD* (NAGY et al., 2015).

### **1.6 O INAGEMP – Instituto Nacional de genética Médica Populacional e histórico para esta investigação**

Este projeto está inserido dentro de um contexto maior, os assim chamados Institutos Nacionais de Ciência e Tecnologia (INCTs) apoiados pelo Conselho Nacional de Pesquisa. Nosso projeto faz parte do INCT Genética Médica Populacional (INaGeMP) (CNPq; processo N<sup>o</sup>: 573993/2008-4). A Genética Médica Populacional (GEMEPO) é uma seção da Genética Médica que tem como objeto de estudo e atenção médica uma população (Castilla, 2005). A GEMEPO conjuga a Genética Clínica com a Genética de Populações Humanas, Genética Epidemiológica, e com a Genética Comunitária, na interface com a saúde pública, fundamentando ações de saúde preventivas.

Em 2009 foi criado o Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Genética Médica Populacional (INaGeMP – [www.inagemp.bio.br](http://www.inagemp.bio.br)). O programa do INaGeMP inclui ações coordenadas das equipes das instituições associadas e colaboradoras em pesquisa, prevenção, diagnóstico e tratamento de doenças com fortes componentes genéticos na sua etiologia, assim como formação de recursos humanos na área e ações de transferência de conhecimento para a sociedade através da divulgação científica e educação das comunidades afetadas.

### **1.7 Justificativa**

Durante a elaboração do projeto original de GEMEPO o autor desta tese e sua colega Erlane M Ribeiro haviam identificado uma comunidade no interior do Ceará em que residia uma família numerosa com uma alteração dermatológica de

herança aparentemente dominante, sugestiva de tricoepitelioma (Castilla e Schüller-Faccini, 2014). No Brasil, são escassos os trabalhos com genodermatoses apesar da importância de Freire-Maia em trabalhos clássicos (VISINONI et. al., 2009; FREIRE-MAIA et.al., 2001).

Desta forma, a presente tese, junto com outros trabalhos do grupo do INaGeMP procura focalizar em doenças dermatológicas hereditárias (genodermatoses). Neste caso específico, o tricoepitelioma familiar trata-se de uma condição genética rara, de herança autossômica dominante, com alta penetrância e expressividade variável. Entre os problemas de saúde, destaca-se a ocorrência de câncer de pele tipo basocelular. O estudo de famílias com muitos afetados tanto do ponto de vista clínico como molecular, permite não apenas a identificação da mutação patogênica, mas também a identificação de genes modificadores possivelmente envolvidos na manifestação fenotípica desta condição. Esta abordagem também permite aprofundar o conhecimento sobre as rotas de genes envolvidos no desenvolvimento do tecido ectodérmico.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Estudar a variabilidade fenotípica e identificar as mutações germinativas causadoras de tricoepitelioma múltiplo familiar (TMF) em famílias brasileiras

### **2.2 Objetivos específicos**

- Caracterizar a manifestação clínica do fenótipo do tricoepitelioma e anomalias associadas em famílias com TMF de herança autossômica dominante.
- Construir heredogramas detalhados para avaliação do modo de herança – penetrância expressividade
- Investigar a presença de mutações responsáveis pelo TMF nos indivíduos afetados
- Investigar outras mutações e/ou polimorfismos relacionados à sua expressão fenotípica

- Oferecer aconselhamento genético para os interessados e orientação quanto a possibilidades de tratamento e cuidados dentro do sistema de saúde brasileiro

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Delineamento**

Trata-se de um estudo transversal, observacional, investigando membros de famílias afetadas.

#### **3.2 Sujeitos**

Este estudo inicia-se através de uma família identificada pelos pesquisadores Anderson Pontes Arruda e Erlane Marques Ribeiro em Aracati, Ceará (localizado em 4°33'43"S, 37°46'12"W e com código do município: 2301109), encontra-se uma família de pescadores composta de 4 gerações de indivíduos vivos portadores de Tricoepitelioma Familiar Múltiplo, com aparecimento de carcinoma basocelular derivados de algumas lesões em alguns indivíduos.

#### **3.3 Análise fenotípica**

O diagnóstico inicial de Tricoepitelioma foi dado através de estudo anatomopatológico por dermatopatologista a partir de biopsias coletadas de lesões de alguns indivíduos desta família. Uma descrição dos tumores associados foi realizada através de exame dermatológico. Exame físico dismorfológico completo foi realizado por uma médica geneticista.

#### **3.4 Critérios de exclusão e inclusão**

Inclusão: Ter características clínicas compatíveis com TMF ou ser familiar em primeiro grau de um indivíduo afetado. Ser maior de 18 anos de idade. Ter concordado em participar, e ter assinado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo1).

Exclusão: ter diagnóstico dermatológico que exclua Tricoepitelioma. Ser incapaz de compreender os objetivos da pesquisa e portanto, não ser autônomo para assinar o TCLE

### **3.5 Coleta de amostra biológica**

Foram coletadas amostras de saliva em kit de extração de DNA comercial Oragene (R) tanto dos indivíduos afetados como seus familiares normais para comparação e interpretação dos resultados moleculares obtidos.

O material genético obtido está armazenado no Departamento de Genética da UFRGS, sob-responsabilidade da pesquisadora principal desta instituição e orientadora deste trabalho.

Nos indivíduos afetados, biópsia de pele para análise dermatopatológica foi realizada por dermatologista especializado, participante da equipe.

### **3.6 Determinação genotípica**

#### **3.6.1 Coleta e Obtenção de DNA**

Foi extraído DNA a partir de células da mucosa bucal presentes na saliva de 20 indivíduos afetados e seis familiares saudáveis, a partir do kit DNA-Sal™ (Oasis Diagnostics). O material coletado foi diluído e aliquoteado para uso em técnicas moleculares, conforme determinação do fabricante, e armazenado em freezer - 20°C.

#### **3.6.2 Sequenciamento Sanger**

A fim de se obter o sequenciamento dos éxons 9 a 20 do gene *CYLD*, foram desenhados doze pares de primers na ferramenta PrimerBlast (NCBI, National Institute of Health), conforme descritos na Tabela 1. Todos os fragmentos amplificados continham os éxons de interesse e pelo menos 50pb de cada um dos íntrons adjacentes.

Foi realizada uma PCR convencional, utilizando-se os primers em concentração de 10pmol, de quatro indivíduos, sendo dois afetados (III-6 e V-7) e dois não-afetados (V-6 e III-5). A amplificação de todas as reações foi conferida a partir da aplicação de eletroforese em gel de agarose 2%, sendo visualizados os fragmentos de interesse em transiluminador com o uso do corante fluorescente GelRed™ (Uniscience).

Todas as amostras que tiveram boa amplificação foram purificadas e preparadas para sequenciamento pelo método Sanger, no equipamento ABI 3730XL (Applied Biosystems). As reações de sequenciamento foram executadas na Unidade de Análises Moleculares e Proteicas, do Centro de Pesquisas Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. A leitura e análise dos sequenciamentos foram realizadas no programa CodonCode Aligner v.3.7.1 (CodonCode Corporation), sendo utilizadas as sequências de referência disponíveis no GenBank (NCBI, National Institute of Health).

### 3.6.3 Sequenciamento de Exoma

O sequenciamento do exoma de um familiar afetado (III-6) foi realizado na empresa Mendelics© Análise Genômica S.A. Foi disponibilizado o arquivo *variant call file* (vcf), a partir do alinhamento com o genoma humano de referência GRCh37 (hg19). A partir das coordenadas genômicas foi executada a análise das variantes presentes nos genes *CYLD* e *PTCH*, e da região 9p21. Foram também avaliados outros genes com interação conhecida a partir de ensaios experimentais, conforme disponível da ferramenta STRING Database (SZKLARCZYK et. al., 2015) e no banco de dados Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM, National Institute of Genetic Medicine, John Hopkins University).

A natureza de todas as variantes encontradas nas regiões analisadas foi avaliada no banco de dados Ensembl (Sanger Institute). Foi realizada a predição funcional de todas as alterações não registradas, bem como todas as indicadas como potencialmente patogênicas pelas ferramentas Polymorphism Phenotyping-2 (PolyPhen2) (ADZHUBEI et. al., 2010) e SIFT (J. Craig Venter Institute).

A confirmação da presença das variantes encontradas foi realizada por sequenciamento Sanger, nas mesmas condições descritas acima. Os primers utilizados para amplificação dos fragmentos contendo essas alterações estão descritos na Tabela 2. Em havendo identificação de possível mutação causadora na análise do exoma, os demais membros da família devem ser testados para confirmação da presença da mutação nos afetados e ausência nos saudáveis.

Tabela 2: Sequência dos primers desenhados para realização de PCR convencional dos genes de interesse, e tamanho dos fragmentos amplificados.

Gene	Nome do Primer	Sequência (sentido 5'-3')	Tamanho do fragmento (pb)
<i>CYLD</i>	Exon 9 Forward	CTCCTATCTTGACTTTTGGGCTG	506pb
	Exon 9 Reverse	AGCAGTACGGTTCAAACGTGTGTA	
	Exon 10 Forward	AGGTGGGCAGTTGGACTAGAT	664pb
	Exon 10 Reverse	AGGACAAGTGGGTCGCAAGC	
	Exon 11 Forward	GAGGTTCTCAGTACAGGTGCG	420pb
	Exon 11 Reverse	CTTAATGAGCGTTGGCAAGAAA	
	Exon 12 Forward	TCAAATAGCAGTTAACCAAAGCC	456pb
	Exon 12 Reverse	TCCCTTTCAATCCTGACCCAC	
	Exon 13 Forward	GGTCCTGGTACCTGTGTTAAT	394pb
	Exon 13 Reverse	TAAGAACTAATTTTCACCCATCTCT	
	Exon 14 Forward	TGACATACTGGAGTTGTATAAGA	848pb
	Exon 14 Reverse	AGGGAAGACTCAGTGGGAAA	
	Exon 15 Forward	TCAGGAAAACCTTGAAAACCTGTGCT	361pb
	Exon 15 Reverse	TGCATGATATTCCCCTAGCCT	
	Exon 16 Forward	TCTCTCTGTTGTTCTGACTATCCA	400pb
	Exon 16 Reverse	TTTCTTAACAGTTTGTGTTTCA	
	Exon 17 Forward	TCATGAGCCACTTGAAGACTTG	416pb
	Exon 17 Reverse	TGAATTGCCTTGGGAAATACTGT	
Exon 18 Forward	AGCAGATGGAAGAGAAAGAGAC	346pb	
Exon 18 Reverse	AACTTTCCAAAACGAGCATTGT		

	Exon 19 Forward	AGCCCATTCACCTTGACACATTG	
	Exon 19 Reverse	TTCCTTAGTTCAGCTAGCAAGGTT	729pb
	Exon 20 Forward	CCAGGCAGGATAGTGGGTTG	
	Exon 20 Reverse	CACCCAGCACACTTCACCAT	586pb
<i>IFNA17</i>	IFNA17 Forward	AACTAGGGCATTTAGAAAATGGAAA	
	IFNA17 Reverse	CAGGTTGTAAAGTCAGCCTCG	1129pb
<i>PIK3CA</i>	PIK3CA Forward	TACACAGTGCTGCCAGTCTTG	
	PIK3CA Reverse	TTTCCTAGTTGATGAGCAGGGTT	305pb
<i>SQSTM1</i>	SQSTM1 Forward	ATCCACACGCTGAGTGCCA	
	SQSTM1 Reverse	AAGGCGATCTTCCTCATCTGCT	350pb

#### 4. ASPECTOS ETICOS

Este projeto foi aprovado quanto aos seus aspectos éticos pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, e encontra-se registrado na plataforma Brasil (CAEE No. 30802513.0.0000.5347) Todos os indivíduos ou seus responsáveis foram informados dos objetivos do projeto e assinara Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (anexo 1), autorizando os estudos moleculares bem como a publicação das fotografias de maneira anônima.

Riscos envolvidos: A coleta de saliva é um procedimento indolor e foi realizada por pessoal devidamente treinado utilizando um recipiente descartável e individual. O contato da boca é com a parte esterilizada do recipiente, portanto o risco de contaminação e desconforto com a coleta é mínimo.

A coleta do material para biopsia foi realizada por um profissional médico, em um ambiente adequado (limpo), sob anestesia local (mínimo de dor) onde foi retirada uma amostra de pele (lesão) de 4 mm, suturado com fio de nylon e feito curativo, utilizando material estéril. O risco de contaminação é mínimo.

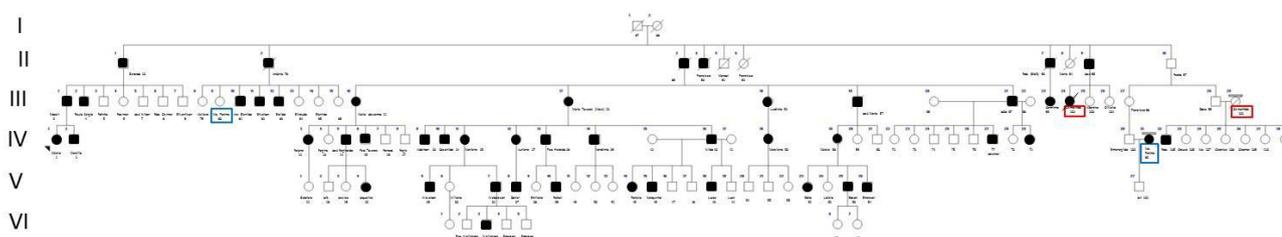
## 5. RESULTADOS

### 5.1 Descrição da família e heredograma

O estudo incluiu uma família brasileira da cidade de Aracati (4°33'43"S, 37°46'12"W) composta por 111 indivíduos onde 48 são afetados, apresentando numerosos nódulos firmes e pápulas cor da pele, em forma de cúpula, na face e no nariz, com um intervalo de tamanho de 2-10 mm.

O heredograma desenhado da família está apresentado na Figura 1. No Anexo 2 apresentamos a coleta de dados tabulada utilizada para a formatação deste heredograma. Há um predomínio de homens afetados (32) comparado a mulheres (16). Dentre os afetados, 31 foram examinados por médica geneticista e por dermatologista experientes. Todos foram diagnosticados com tricoepiteliomas com base em características clínicas e em uma foi coletada lesões da face confirmando tricoepitelioma e ainda carcinoma basocelular através de exame anatomopatológico e histológico. O restante da família é composto por 60 indivíduos normais, sendo 24 homens e 36 mulheres e ainda 3 indivíduos sendo um homem e duas mulheres aos quais não se sabe se são afetados ou normais.

**Figura 1. Heredograma da família**



O estudo molecular incluiu 20 pacientes afetados com vários tricoepiteliomas, sendo 8 mulheres com idades entre 25-68 anos, e 12 homens com idades entre 14-88 anos (Figura 2). Foram incluídos ainda 6 indivíduos da mesma família, porém normais, sendo três homens com idades entre 24-38 anos

e três mulheres com idades entre 14-40 anos como controles (Figura 3). Dos 20 indivíduos afetados apenas de 2 não foi possível tirar foto.

**Figura 2. Foto de 18 dos 20 familiares afetados que participaram do estudo molecular**



**Figura 3. Foto dos 6 familiares normais que participaram do estudo molecular**



Em duas pacientes femininas (DNA coletado), desenvolveram junto aos tricoepiteliomas o aparecimento de carcinomas basocelular. Estas lesões foram removidas com margem de segurança para evitar possível malignização.

Encontramos uma variação fenotípica tanto entre homens e mulheres, quanto entre os mais novos e mais velhos em relação à quantidade de lesões, bem como na gravidade dessas lesões. Alguns indivíduos mais novos apresentam mais lesões do que indivíduos mais velhos como, por exemplo, os indivíduos IV-6 que com 29 anos de idade que apresenta um número maior de lesões que o indivíduo II-1 com 90 anos de idade dentre os homens e os indivíduos V-4 com 27 anos de idade que apresenta mais lesões que o indivíduo IV-3 com 33 anos de idade entre as mulheres. Nessa família a idade mínima de início do aparecimento das lesões foi de 3 anos e a máxima de 20 anos

## **5.2. Investigação das mutações**

### **5.2.1. Investigação de mutações responsáveis pelo TMF nos indivíduos afetados**

O sequenciamento dos éxons 9 ao 20 mostrou uma troca de base (C>T) em heterozigose no éxon 18 em uma afetada. Essa troca é sinônima e está descrita nos bancos de dados como um polimorfismo, rs2066852, com frequência do alelo menor (MAF) estimada em 0,08. Outros dois polimorfismos, rs17222902 e rs2302759, foram encontrados nas porções adjacentes dos íntrons 10 e 17, respectivamente, com MAFs de 0,08 e 0,2. Todos os polimorfismos estão descritos na Tabela 3.

Considerando a ausência de mutações nos éxons com relatos prévios de mutações associadas à TMF, e regiões flanqueadoras dos íntrons, decidiu-se então por prosseguir com o sequenciamento do exoma completo de um dos membros afetados.

### 5.2.2. Sequenciamento de exoma

Para esta etapa, foi selecionado um indivíduo com múltiplos sintomas e progenitor de outros afetados. Estabelecemos uma prioridade hierárquica para análise do sequenciamento do exoma. Inicialmente verificamos todo o gene *CYLD*. Os éxons restantes do gene não mostraram nenhuma alteração com relação à sequência referência. Na porção previamente sequenciada pelo método Sanger foi confirmada a presença dos três polimorfismos previamente descritos (Tabela 3).

Logo após o gene *PTCH* localizado em 9q22.3 foi analisado também, sendo identificados polimorfismos (Tabela 3), mas não mutações descritas como patogênicas ou que parecem estar causando o TMF.

Foram também avaliados outros genes com interação conhecida a partir de ensaios experimentais, conforme disponível da ferramenta STRING Database e no banco de dados Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM, National Institute of Genetic Medicine, John Hopkins University). Identificamos três possíveis variações causadoras em genes que pertencem à rota do *CYLD* ou associados a tumores de pele. *SQSTM1*, *IFNA17* e *PIK3CA*. A confirmação da presença das variantes encontradas foi realizada por sequenciamento Sanger.

No *SQSTM1* encontramos uma variante que causa uma mudança de bases nitrogenadas de T>C, ainda não descrita nos bancos de dados e tida como potencialmente patogênica através da análise nos preditores funcionais. Polymorphism Phenotyping-2 (PolyPhen2)(Anexo 3) e SIFT (J. Craig Venter Institute) (Anexo 3). Na confirmação por Sanger encontramos a presença da variante tanto em indivíduos afetados como em indivíduos saudáveis, eximindo assim essa alteração com causadora do TMF.

Muitos autores sugerem que a região 9p21 seria responsável tanto por causar o tricoepitelioma como o carcinoma basocelular. Avaliamos também essa região através do exoma e encontramos uma variação (A>AT) no único éxon do gene (Éxon 1) com MAF de 0,01. Essa troca causa um *frameshift* com rs200400518. Essa alteração é descrita como potencialmente patogênica nos preditores

funcionais no gene interferon-17 (*IFNA17*) (Anexo 4). A presença dessa variante nos outros membros da família será confirmada pelo sequenciamento Sanger. No entanto, esse gene, assim como outros da família interferon, é caracteristicamente muito polimórfico o que tem dificultado a padronização do PCR para obtenção do sequenciamento.

O próximo gene candidato para análise foi o *PIK3CA*. Encontramos uma mutação patogênica em *PIK3CA* (Chr3:178,941,888-178,941,890 TTG>T). Isso causa um frameshift na posição do aminoácido 736 (exon 14)(Tabela 3). Acreditamos que esta possa ser a causa da doença familiar. O sequenciamento Sanger da mutação encontrada está em fase de análise.

Tabela 3. Principais polimorfismos e variantes encontrados no exoma

Gene	Cromossomo	Alteração <sup>a</sup>	Posição	Código de Referência	MAF	Característica
<i>CYLD</i>	16	G>A	Íntron 10-11	rs17222902	8%	-
		C>T	Éxon 18	rs2066852	8%	Sinônima
		A>G	Íntron 18-19	rs2302759	20%	-
<i>PTCH1</i>	9	A>G	Éxon 12	rs1805155	11%	Sinônima
		A>G	Íntron 14-15	rs16909898	9%	-
		C>G	Íntron 15-16	rs2066829	39%	-
		T>C	Íntron 17-18	rs2236406	39%	-
<i>IFNA17</i>	9	A>AT	Éxon 1 <sup>b</sup>	rs200400518	1%	Frameshift <sup>c</sup>
<i>SQSTM1</i>	5	T>C	Éxon 7	Variante nova	-	Missense <sup>c</sup>
<i>PICK3CA</i>	3	TTG>T	Éxon 14		-	Frameshift <sup>c</sup>

<sup>a</sup>Todos alterações descritas se encontravam em heterozigose;

<sup>b</sup>O gene *IFNA17* só possui um éxon;

<sup>c</sup>Classificadas como potencialmente patogênicas por preditores funcionais.

## 6. DISCUSSAO

Encontramos uma grande família de vários afetados com Tricoepitelioma Múltiplo Familiar. Até o momento não foi descrita na literatura uma família com TMF no Brasil com a quantidade de indivíduos afetados e também com o grande número de lesões. Esta comprovação pode ser vista na tabela abaixo.

**Tabela 1. Mutações descritas na literatura no gene *CYLD* associadas ao Tricoepitelioma**

Autor/ Ano	Pais	n	Tipo de Mutação	Gene	Exon
Lv, 2014	China	6	*Nonsense (1112C>A)	<i>CYLD</i>	9
Li, 2014	China	8	Missense (1112C>A)	<i>CYLD</i>	9
Linos, 2011	Europa	3 fam.	Nonsense (1112C>A/p.S371X)	<i>CYLD</i>	9
Liang, 2008	China	4	Nonsense (1364_1365 del AA)	<i>CYLD</i>	10
Zheng, 2004	China	3 fam.	* <i>Frameshift</i> (c.1462delA)	<i>CYLD</i>	10
Wu, 2014	China	16	* <i>Frameshift</i> (c.1169-1170delCA)	<i>CYLD</i>	10
Ying, 2012	China	4	* <i>Frameshift</i> (c.1178-1179delCA)	<i>CYLD</i>	10
Zuo, 2007	China	5	Missense (1787G>A)	<i>CYLD</i>	11
Chen, 2011	China	4	* <i>Frameshift</i> (c.1925delC)	<i>CYLD</i>	11
Liang, 2005	China	12	Splice (1862+2T>G)	<i>CYLD</i>	12
Huang, 2009	Taiwan	3	Splice (IVS12+1G>A)	<i>CYLD</i>	12
Reuven, 2013	Israel	3	* <i>Frameshift</i> (c.1843delT)	<i>CYLD</i>	13
Salhi, 2004	Algeria	13 fam.	* <i>Frameshift</i> (c.2104-2105insA)	<i>CYLD</i>	15
Almeida, 2008	Suíca	4	Missense (c.2433A>G)	<i>CYLD</i>	15
Guardoli, 2015	Italia		* <i>Frameshift</i> (c.270delT)	<i>CYLD</i>	15
Liang, 2005	China	12	Nonsense (c.2241-2241delAG)	<i>CYLD</i>	16
Melly, 2012	Inglaterra	1	Nonsense (c.2116-2117insATTAG)	<i>CYLD</i>	16
Young, 2006	EUA	3	Missense (c.2806C >T)	<i>CYLD</i>	16
Zheng, 2004	China	3 fam.	*Nonsense (c.2128C>T)	<i>CYLD</i>	17
Wang, 2010	China	4	Missense (c.2317G->A)	<i>CYLD</i>	17
Bowen, 2005	Italia	2 fam.	Nonsense (c.2339T>G)	<i>CYLD</i>	17
Lv, 2014	China	3	* <i>Frameshift</i> (c.22255delT)	<i>CYLD</i>	17
Lv, 2014	China	4	*Nonsense (c.2299A>T)	<i>CYLD</i>	17
Chen, 2011	China	3	*Nonsense (c.2128C >T)	<i>CYLD</i>	17
Zhang, 2004	China	7	<i>Frameshift</i> (c.2355-2358delCAGA)	<i>CYLD</i>	18
Liang, 2008	China	4	Nonsense (c.2409G>C)	<i>CYLD</i>	18
Espana, 2007	Espanha	4	Missence (c.2687G>C)	<i>CYLD</i>	20
Lv, 2008	China	4	Missense (c.2711C> T)	<i>CYLD</i>	20
Zheng, 2004	China	3 fam.	Missense (c.2822A>T)	<i>CYLD</i>	20
Qian, 2014	China	2	<i>Frameshift</i> (c.2815delC)	<i>CYLD</i>	20
Vanecek, 2014	Russia	1	Deleção (-34111_297858del378779) CGH	<i>CYLD</i>	Todos

\* Mutação induzindo stop-códon

No nosso trabalho, não foi possível identificar a mutação causadora do quadro clínico desta família. Este fato pode ser explicado pelos seguintes fatos.

Ao investigarmos o sequenciamento dos éxons 9 ao 20 não encontramos nenhuma mutação patogênica apesar de encontrarmos 3 polimorfismos. Uma troca de base (C>T) em heterozigose no éxon 18 em uma afetada. Essa troca é sinônima e está descrita nos bancos de dados como um polimorfismo. Outros dois polimorfismos, uma troca de base (G>A) nas porções adjacentes dos íntrons 10-11 e uma troca de base (A>G) nas regiões adjacentes dos íntrons 18-19. Este achado vai contra a maioria dos artigos publicados sobre o TMF onde a maioria das mutações do gene *CYLD* que causam o TMF estão nessa porção do gene (VANECEK et. al., 2014; NAGY et. al., 2015).

Casos de ausência de mutação germinativas no gene *CYLD* também foram descritas por outros estudos. A frequência de mutações de ponto do *CYLD* em pacientes com TMF é de 44-72% (ZHAO et.al., 2014). Raramente, grandes deleções germinativas podem ocorrer. Porém Venecek e colaboradores (2014) encontraram uma mutação c.914-6398\_1769del13642ins20 (g.50802679\_50816320del13642ins20). Esta deleção começa no íntron 6, termina no éxon 12, do gene *CYLD* e é acompanhado por uma pequena inserção de 20 pb de origem desconhecida (VANECEK et al., 2014).

Realizamos o sequenciamento do exoma e verificamos os éxons restantes do gene *CYLD* que não mostraram nenhuma alteração que pudesse ser causadora do TMF com relação à sequência referência nem nos éxons e nem nas regiões de íntrons flanqueadoras dos éxons do gene *CYLD*. O exoma apenas corroborou os polimorfismos que foram encontrados no sequenciamento Sanger do gene *CYLD*.

Logo após a avaliação do gene *CYLD* por completo, partimos para a avaliação do gene *PTCH* localizado em 9q22.3 sendo identificados 4 polimorfismos. Uma troca de base (A>G) em heterozigose no éxon 12 em uma afetada. Essa troca é sinônima e está descrita nos bancos de dados como um polimorfismo. Encontramos também três polimorfismos em regiões intrônicas,

uma troca de base (A>G) nas porções adjacentes dos íntrons 14-15, uma troca de base (C>G) nas regiões adjacentes dos íntrons 15-16 e uma troca de bases (T>C) nas regiões adjacentes dos íntrons 17-18, mas não mutações descritas como patogênicas ou que parecem estar causando o TMF. Diante disto fomos procurar outras variações encontradas no exoma em regiões que possuem genes alvos do *CYLD* e posteriormente fizemos uma análise de genes relacionados a tumores de pele.

Ponti et al (2012) investigaram dois indivíduos com BSS através da análise molecular das regiões que flanqueiam os éxons dos genes *CYLD* e *PTCH* e não detectaram mutação germinativa ou somática. Eles sugerem que outros genes devem estar envolvidos e que mais estudos devem ser realizados procurando mutações novas germinativas (PONTI et al., 2012).

Foram também avaliados outros genes com interação conhecida a partir de ensaios experimentais, conforme disponível da ferramenta STRING Database e no banco de dados Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM, National Institute of Genetic Medicine, John Hopkins University). Identificamos três possíveis variações causadoras em genes que pertencem à rota do *CYLD* ou associados a tumores de pele. *SQSTM1*, *IFNA17* e *PIK3CA*. A confirmação da presença das variantes encontradas foi realizada por sequenciamento Sanger.

Investigamos o gene *SQSTM1* devido haver uma relação entre este gene e o gene *CYLD* e possuir um polimorfismo potencialmente patogênico e ainda não descrito nos bancos de dados de genes. através da análise no de predição funcional pelas ferramentas Polymorphism Phenotyping-2 (PolyPhen2) e SIFT (J. Craig Venter Institute). Na confirmação por Sanger encontramos a presença desta variante tanto em indivíduos afetados como em indivíduos saudáveis, eximindo assim essa alteração como causadora do TMF.

A proteína *SQSTM1* serve como um adaptador para a formação de um complexo, regulando assim a atividade de *DUB* e *CYLD* por interação *TRAF6* (WOOTEN et.al,2008).

Muitos autores sugerem que a região 9p21 seria responsável tanto por causar o tricoepitelioma como o carcinoma basocelular. Avaliamos também essa região através do exoma e encontramos uma variação na região do gene codificador do interferon IFNA17, localizado na região 9p21, encontramos uma alteração potencialmente patogênica, segundo os mesmos preditores funcionais. Sua ocorrência nos outros membros da família, afetados ou não, será confirmada através de sequenciamento Sanger. Essa região do *IFNA17* é muito polimórfica, dificultando a realização do sequenciamento desta região. Estamos ainda padronizando os testes para o sequenciamento dessa região.

Em 1996, Harada et al. relataram ligação de TMF autossômico dominante à região cromossômica 9p21 (HARADA et al, 1996). Tendo em vista a evidencia anterior para a região 9p21, estes resultados sugerem a heterogeneidade genética da TMF (SALHI et al., 2004). Por outro lado, heterogeneidade genética também não pode ser descartada, pois genes ainda não identificados, como, por exemplo, na região 9p21 poderiam levar igualmente ao TMF (ZHANG, 2004). Ainda não é claro se a função anormal de outros genes também pode ser a causa da TMF, tal como relatado no locus do cromossomo 9p21 (ZHAO et. al., 2014).

Nagy et. al. (2015) catalogou um total de 95 mutações diferentes causadoras de doenças que foram publicadas até o momento para o gene *CYLD*. A maioria das mutações são do tipo: *frameshift* (48%), *nonsense* (27%), *missense* (12%) e *splice-site* (11%). No entanto, duas deleções *in-frame* foram também relatadas. Um estudo realizado por Zhao e colaboradores em 2014 mostrou que não foram encontrados mutações no gene *CYLD*. Isto provavelmente ocorre devido a mutações subjacentes em regiões não codificantes (introns, 3'UTR e 5' UTR), rearranjos de fragmentos ou deleções cromossômicas. Desta forma, a próxima etapa neste trabalho será a de investigar microdeleções através de hibridização genômica comparativa.

## **7. Perspectivas futuras**

Diante do resultado negativo para as prováveis mutações do exoma e também da ausência de mutação no gene *CYLD* iremos realizar a Hibridização Genômica Comparativa (CGH Array) a procura de alguma deleção ou duplicação no gene *CYLD* que não pode ser identificada nos testes já realizados.

Rearranjos de fragmentos ou deleções cromossômicas podem ser a causa do tricoepitelioma onde não há mutações no gene *CYLD* (ZHAO et.al., 2014; VANECEK et. al., 2014). Utilizando a técnica de Hibridização Genômica Comparativa (CGH Array), Vanecek e colaboradores (2004) encontraram uma grande deleção no gene *CYLD* em uma paciente com TMF.

## **8. CONCLUSÃO**

Descrevemos uma grande família com muitos afetados no interior do Ceará - Brasil ainda não descrita na literatura mostrando assim a grande importância desse trabalho.

Apesar de vários estudos moleculares já realizados ainda não conseguimos encontrar a mutação causadora do TMF na família avaliada.

É necessária a continuidade desse trabalho para saber qual a causa do TMF nessa família. Iremos continuar o trabalho realizando um CGH-Array para verificar se não há grandes deleções no cromossomo 16 que seja capaz de causar a doença.

## **Anexo 1. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).**

### **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Adulto)**

Projeto: TRICOEPITELIOMA MÚLTIPLO FAMILIAR: DELINEAMENTO FENOTÍPICO E GENÉTICO

Estamos estudando fatores genéticos que podem causar um problema de pele familiar raro que se chama tricoepitelioma familiar, que ocasiona tumores benignos na pele. Para isso, vamos analisar história de famílias com tricoepitelioma, onde são importantes informações tanto dos afetados, como dos seus familiares sem estes tumores. Precisaremos realizar uma entrevista com perguntas sobre a história da sua família, fazer um exame clínico em você e seus filhos (se tiver), coletar amostras de saliva sua e de seus filhos e realizar fotografias do seu rosto e de seus filhos.

Além disso, se você autorizar, iremos consultar seus registros médicos e de seus filhos em hospitais ou postos de saúde para obter informações complementares.

Gostaríamos de pedir a sua autorização para realizar estes procedimentos. Algumas pessoas podem preferir participar de apenas uma etapa da pesquisa e não de outras, sem que isso seja um impedimento. O material coletado será utilizado única e exclusivamente para fins do projeto de pesquisa, isto é para a pesquisa de fatores envolvidos no tricoepitelioma, sendo garantido o sigilo das informações obtidas. As análises dos fatores genéticos será feita no Departamento de Genética na Universidade Federal do Rio Grande do Sul .

A coleta de saliva é um procedimento indolor e será realizada por pessoal devidamente treinado utilizando um recipiente descartável e individual. O contato da boca é com a parte esterilizada do recipiente, portanto o risco de contaminação é muito pequeno.

Você terá direito ao acesso aos resultados da investigação genética. Se tiver interesse, vamos lhe entregar estes resultados através de uma consulta médica que se chama aconselhamento genético. Nesta consulta explicaremos o que estes resultados significam para sua saúde e de seus filhos. Poderemos lhe explicar também quais são as chances que você tem de ter filhos com tricoepitelioma e que tipos de tratamento são disponíveis para melhorar a sua saúde.

Os pesquisadores responsáveis pelo projeto são a médica geneticista, profa. Lavinia Schuler-Faccini, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (51-3308-9826) e o prof. Anderson Pontes Arruda (85-91172027) que poderão ser contatadas em caso de dúvidas, assim como o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (51 3308-3629).

Ao participar deste projeto você tem o direito de receber resposta à qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida a cerca da pesquisa. Também tem liberdade de não participar do estudo ou de mudar de idéia mesmo depois de ter concordado.

**A. Consentimentos dados pelo participante com idade adulta legal**

**Coleta de dados familiares e de saúde (entrevista)**

- Concordo em fornecer informações sobre mim e minha família, relacionadas ao nascimento de pessoas com tricoepitelioma e outros dados de saúde.
- Não concordo em fornecer informações sobre mim e minha família, relacionadas ao nascimento de pessoas com tricoepitelioma e outros dados de saúde.

**Exame físico e dermatológico**

- Concordo em ser examinado por médicos geneticistas e dermatologistas.
- Não concordo em ser examinado por médicos geneticistas e dermatologistas.

**Coleta de material biológico (saliva)**

- Concordo em fornecer amostra de saliva para extração de DNA para análise de fatores genéticos envolvidos com tricoepitelioma
- Não concordo em fornecer amostra de saliva para extração de DNA para análise de fatores genéticos envolvidos com tricoepitelioma

**Coleta de fotografias**

- Autorizo a realização de fotografias de meu rosto
- Não autorizo a realização de fotografias de meu rosto

**Autorização para acesso de informações de prontuários**

- Autorizo a consulta de dados dos meus prontuários médicos.
- Não autorizo a consulta de dados dos meus prontuários médicos.

Declaro que li ou me foi lido este termo e que minhas dúvidas foram esclarecidas antes da concordância na participação. Declaro ainda que uma copia deste termo me foi fornecida.

Nome do participante: \_\_\_\_\_

Assinatura ou impressão digital: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

Testemunha no caso de participante não alfabetizado: \_\_\_\_\_

Nome do pesquisador: Anderson Pontes Arruda

Assinatura: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

## Anexo 2. Dados tabulados para a construção do Heredograma

NOME	INDIVIDUO	PAI	MÃE	POSIÇÃO	SEXO	VIVO/ MORTO	ANO NASC.	AFETADO
Marcia Adriana Simoes da Silva	1	3		IV-1	2	1	1985	1
Marcilio Simoes da Silva	2	3		IV-2	1	1	2000	1
Moacir Barbosa da Silva	3	10		III-1	1	1		1
Paulo Sérgio Barbosa da Silva	4	10		III-2	1	1		1
Raimundinho	5	10		III-3	1	1		2
Rosimar	6	10		III-4	2	1		2
Jose Nilton da Silva	7	10		III-5	1	1	1990	2
Raimundo Osimar Barbosa da Silva (Bilu)	8	10		III-6	1	1	1976	2
Elivanilson Barbosa da Silva	9	10		III-7	1	1		2
Gerardo Santana da Silva (Gerardo)	10	87	88	II-1	1	1	1926	1
Maria do Carmo Tavares Pereira (Carminha)	11	89		III-16	2	1	1949	1
Rejane Tavares do Nascimento	12		11	IV-3	2	1	1983	1
Regina Tavares Pereira	13		11	IV-4	2	1	1974	2
José Reginaldo Tavares Perereira	14		11	IV-5	1	1	1968	1
Fco José Tavares do Nascimento	15		11	IV-6	1	1	1987	1
Renato	16		11	IV-7	1	1	1984	2
Regis	17		11	IV-8	1	1		2
Jefs	18	14		V-2	1	1		2
Jessica	19	14		V-3	2	1		2
Jaqueline Barbosa Pereira	20	14		V-4	2	1	1989	1
Gabriela	21		12	V-1	2	1	2005	2
Maria Tavares dos Santos (Mazé)	22	89		III-17	2	1	1946	1
Aldeirton Tavares dos Santos	23		22	IV-9	1	1		1
Cesanildo Tavares dos Santos	24		22	IV-10	1	1		1
Marilene Tavares dos Santos Braga	25		22	IV-11	2	1		1
Weverton dos Santos Braga	26		25	V-5	1	1	1993	1
Aurilene Tavares dos santos	27		22	IV-12	2	1	1978	1
Francisco Haroldo Tavares dos Santos	28		22	IV-13	1	1	1967	1
Vandinho	29		22	IV-14	1	1		1
Williana dos Santos Braga	30		25	V-6	2	1	1990	2
Webersson dos Santos Braga	31		25	V-7	1	1	1989	1
filha Williana	32		30	VI-1	2	1	2009	2
Fco Wellington	33	31		VI-2	1	1	2013	2
Wellington	34	31		VI-3	1	1	2010	1
Emerson	35	31		VI-4	1	1	2007	2
Erberson	36	31		VI-5	1	1	2006	2
Daniel	37		27	V-8	1	1	1999	1

Emiliane Lima dos Santos	38	28		V-9	2	1	2000	2
Rafael	39	28		V-10	1	1		1
Nildo	40		22	IV-16	1	1		1
Esposa 1 Nildo	41			IV-17	2	1		2
Esposa 2 Nildo	42			IV-15	2	1		2
Lucas	43	40	41	V-18	1	1	2009	1
Luan	44	40	41	V-19	1	1	2009	2
Patricia	45	40	42	V-14	2	1		1
Marquinho	46	40	42	V-15	1	1	1994	1
Filho 1 Nildo	47	40	42	V-16	1	1		2
Filho 2 Nildo	48	40	42	V-17	1	1		2
Filha 1 Vandinho	49	29		V-11	2	1		2
Filha 2 Vandinho	50	29		V-12	2	1		2
Filha 3 Vandinho	51	29		V-13	2	1		2
Lurdinha (mãe Marcilene e irma de Mazé e carminha)	52	89		III-18	2	1		1
Marcilene	53		52	IV-18	2	1		1
filho 1 Marcilene	54		53	V-20	1	1		2
filho 2 Marcilene	55		53	V-21	1	1		2
Filha Marcilene	56		53	V-22	2	1		2
José Maria (Irmão de Lurdinha)	57	89		III-19	1	2	(+/-)1954	1
Marcia	58	57		IV-19	2	1		1
Filha José Maria	59	57		IV-20	2	1		2
Filho José Maria	60	57		IV-21	1	1		2
Edna	61		58	V-23	2	1		1
Leticia	62		58	V-24	2	1		2
Edson	63		58	V-25	1	1		1
Emerson	64		58	V-26	1	1		1
Filha 1 Edson	65	63		VI-6	2	1	2012	2
Filha 2 Edson	66	63		VI-7	2	1	2014	2
João (Irmão Lurdinha)	67	89		III-21	1	1	1944	1
Esposa 1 João	68			III-22	2	1		2
Esposa 2 João	69			III-20	2	1		2
Filha 1 da esposa 1 do João	70	67	68	IV-28	2	1		2
Filha 2 da esposa 1 do João	71	67	68	IV-29	2	1		1
Filha 1 da esposa 2 do João	72	67	69	IV-22	2	1		2
Filha 2 da esposa 2 do João (Maezinha)	73	67	69	IV-23	2	1		?
Filho 1 da esposa 2 do João	74	67	69	IV-24	1	1		2
Filho 2 da esposa 2 do João	75	67	69	IV-25	1	1		2
Filho 3 da esposa 2 do João	76	67	69	IV-26	1	1		2
Josemar	77	67	69	IV-27	1	1		1
Antônio (Irmão de Gerardo)	78	87	88	II-2	1	2	1936	1
Alcilene	79	78		III-8	2	1	1984	2
Maria de Fatima da Silva Sena	80	78		III-9/IV-31	2	1		1

Antonio Elenildo da Silva	81	78		III-10	1	1	1977	1
Sergio Erivelton	82	78		III-11	1	1	1969	1
Ercildo	83	78		III-12	1	1	1967	1
Elineuda	84	78		III-13	2	1	1973	2
Elenilda	85	78		III-14	2	1	1978	2
Filha de Antonio	86	78		III-15	2	1		2
Pai de Antonio e de Gerardo	87			I-1	1	2		?
Mãe de Gerardo	88			I-2	2	2		?
Pai de Carminha e irmãos	89	87	88	II-3	1	2	1944	1
Francisco (irmão de Gerardo)	90	87	88	II-4	1	2	(+/-)1943	1
Manoel	91	87	88	II-5	1	2		2
Francisca	92	87	88	II-6	2	2	(+/-)1945	2
Raimundo (Bibiã)	93	87	88	II-7	1	2	(+/-)1942	1
Maria	94	87	88	II-8	2	2	(+/-)1946	2
Carminha	95	93		III-23	2	1		1
José	96	87	88	II-9	1	1		1
Pedro (Paraíba)	97	87	88	II-10	1	1		2
Francisca	98	97		III-27	2	1		2
Doca	99	97		III-28	1	1		2
Ermenegildo	100	98		IV-30	1	1	1963	2
Jair	101	100	80	V-27	1	1	2002	2
Osmarinda	102	96		III-24/III-29	2	2	1959	1
Albertina	103	96		III-25	2	1		2
Oliveira	104	96		III-26	2	1		2
Raimundo	105	99	102	IV-32	1	1	1984	1
Creuza	106	99	102	IV-33	2	1		2
Maria	107	99	102	IV-34	2	1		2
Cleonice	108	99	102	IV-35	2	1		2
Cleomar	109	99	102	IV-36	2	1		2
Filha	110	99	102	IV-37	2	1		2
Filha	111	99	102	IV-38	2	1		2

## Anexo 3. Analise dos preditores funcionais do gene SQSTM1 pelo PolyPhen-2 e SIFT.

17/11/2015

PolyPhen-2: report for Q13501 I253T

**PolyPhen-2** prediction of functional effects of  
human nsSNPs

[Home](#)

[About](#)

[Help](#)

[Downloads](#)

### PolyPhen-2 report for Q13501 I253T

#### Query

Protein Acc	Position	AA <sub>1</sub>	AA <sub>2</sub>	Description
<a href="#">Q13501</a>	253	I	T	Canonical; RefName: Full=Sequestosome-1; AltName: Full=EBI3-associated protein of 60 kDa; Short=EBIAP; Short=p60; AltName: Full=Phosphotyrosine-independent ligand for the Lck SH2 domain of 62 kDa; AltName: Full=Ubiquitin-binding protein p62; Length: 440

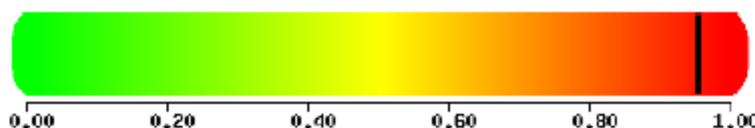
#### References

**HumDiv** is preferred model for evaluating rare alleles, dense mapping of regions identified by genome-wide association studies, and analysis of natural selection

*PolyPhen-2 v2.2.2r398*

#### HumDiv

This mutation is predicted to be **POSSIBLY DAMAGING** with a score of **0.954**  
(sensitivity: **0.79**; specificity: **0.95**)



HumVar

#### Details

**Multiple sequence alignment** *UniProtKB/UniRef100 Release 2011\_12 (14-Dec-2011)*

**3D Visualization** *PDB/DSSP Snapshot 03-Jan-2012 (78304 Structures)*

Software & web support: ivan adzhubey

Web design & development: biobyte solutions



SIFT: PREDICTIONS

User Input	ENSP	Pos	Ref	Subst	Prediction	SIFT Score	Median Information Content	# Seqs
ENSP00000374455,I253T	ENSP00000374455	253	I	T	DAMAGING	0.01	2.53	55

? - Indicates either ENSP or amino acid position not found.

\*DAMAGING - Low confidence predictions with Median conservation above 3.25

## Anexo 4. Analise dos preditores funcionais do gene IFNA17 pelo Mutation Taster.

17/11/2015

no title [MT]



mutation t@sting

[documentation](#)

**Prediction disease causing** Model: *complex\_sae*, prob: 0.99999999831967 [\(explain\)](#)

### Summary

- amino acid sequence changed
- frameshift
- protein features (might be) affected
- splice site changes
- truncated protein (might cause NMD)

### analysed issue analysis result

name of alteration	no title		
alteration (phys. location)	chr9:21228002_21228003insA		
HGNC symbol	<a href="#">IFNA17</a>		
Ensembl transcript ID	<a href="#">ENST00000413767</a>		
Genbank transcript ID	<a href="#">NM_021268</a>		
UniProt peptide	<a href="#">P01571</a>		
alteration type	insertion		
alteration region	CDS		
DNA changes	c.170_171insT cDNA_219_220insT g.219_220insT		
AA changes	D58* Score: 6.0 <a href="#">explain score(s)</a>		
position(s) of altered AA if AAalteration in CDS	58 (frameshit or PTC - further changes downstream)		
frameshift	yes		
known variant	Variant was neither found in ExAC nor 1000G. <a href="#">Search ExAC.</a>		
regulatory features	H3K27me3, Histone, Histone 3 Lysine 27 Tri-Methylation		
phyloP / phastCons	PhyloP	PhastCons	
	(flanking) -0.003	0.016	
	(flanking) -0.423	0.001	
	<a href="#">explain score(s)</a> and/or inspect your position(s) in <a href="#">in UCSC Genome Browser</a>		
splice sites	effect	gDNA position score	wt detection sequence
	Donor marginally increased 213	wt: 0.3681 / mu: 0.4017 (marginal change - not scored)	wt: GAAGGACAGACATGA mu: GAAGGACAGACATTG
	Acc gained	212	0.42
distance from splice site	220		
			mu: CTCC TTTCTCTGCGCTGAAGGACAGACATTGACTTT

## Referencias bibliográficas

1. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods*; 7(4): 248–249, 2010.
2. Alessi SS, Sanches JÁ, Oliveira WR, Messina MC, Pimentel ERA, Neto CF. Treatment of cutaneous tumors with topical 5% imiquimod cream. *Clinics*; 64(10):961-6, 2009.
3. Almeida Jr HL, Boeing M, Amin R, Mendonça R. Tricoepitelioma Desmoplásico. *An bras Dermatol*; 76(4):459-462, 2001.
4. Almeida S, Maillard C, Itin P et al. Five new *CYLD* mutations in skin appendage tumors and evidence that aspartic acid 681 in *CYLD* is essential for deubiquitinase activity. *J Invest Dermatol*; 128:587–593, 2008.
5. Azulay RD, Mantilla PHF, Briggs PL, Azulay DR. Epitelioma basocelular ocorrendo em tricoepitelioma múltiplo: um estudo familiar. *An bras Dermatol, Rio de Janeiro*, 76:1-5, 2001.
6. Bignell GR, Warren W, Seal S, Takahashi M, Rapley E, Barfoot R, et al. Identification Of the familial cylindromatosis tumour-suppressor gene. *Nat Genet*; 25:160-5, 2000.
7. Bowen S, Gill M, Lee DA et al. Mutations in the *CYLD* gene in Brooke-Spiegler syndrome, familial cylindromatosis, and multiple familial trichoepithelioma: lack of genotype-phenotype correlation. *J Invest Dermatol*; 124:919–920, 2005.
8. Chen M, Liu H, Fu X, Yu Y, Yu G, Liu H, Tian H, Zhou G, Zhang D, Wang G, Zhang F. Mutation analysis of the *CYLD* gene in two Chinese families with multiple familial Trichoepithelioma. *Aust J Dermatol*; 52:146–148, 2011.
9. Chinem VP, Miot HA. Epidemiologia do Carcinoma Basocelular. *An Bras Dermatol*; 86:292-305, 2011.
10. Espana A, Garcia-Amigot F, Aguado L et al. A novel missense mutation in the *CYLD* gene in a Spanish family with multiple familial trichoepithelioma. *Arch Dermatol*; 143: 1209–1210, 2007.
11. Fenske C et al. Brooke-Spiegler syndrome locus assigned to 16q12-q13. *J Invest Dermatol*;114:1057, 2000
12. Freire-Maia N, Lisboa-Costa T, Pagnan NA. Ectodermal dysplasias: how many? *Am J Med Genet*; 104(1):84, 2001. PubMed PMID: 11746035.
13. Grossmann P, Vanecek T, Steiner P, et al. Novel and Recurrent Germline and Somatic Mutations in a Cohort of 67 Patients From 48 Families With Brooke–Spiegler Syndrome Including the Phenotypic Variant of Multiple Familial Trichoepitheliomas and Correlation With the Histopathologic Findings in 379 Biopsy Specimens. *Am J Dermatopathol*;35(1):34–44,2013.
14. Guardoli D, Argenziano G, Ponti G, Nasti S, Zalaudek I, Moscarella E, Lallas A, Piana S, Specchio F, Martinuzzi C, Raucci M, Pellacani G, Longo C. A novel *CYLD* germline mutation in Brooke-Spiegler syndrome. *Europ. Acad. Dermat. Venereol.*; 29:457-462, 2015.
15. Haller O, Kochs G, Weber F. *Cytokine & Growth Factor Reviews*; 18(5–6):425-433, 2007.
16. Harada H, Hashimoto K, Ko MS. The gene for multiple familial trichoepithelioma maps to chromosome 9p21. *J Invest Dermatol*;107:41-3, 1996.

17. Huang TM, Chao SC, Lee JY. A novel splicing mutation of the *CYLD* gene in a Taiwanese family with multiple familial trichoepithelioma. *Clin Exp Dermatol*; 34: 77–80,2009.
18. Into T, Inomata M, Niida S, Murakami Y, Shibata K. Regulation of MyD88 Aggregation and the MyD88-dependent Signaling Pathway by Sequestosome 1 and Histone Deacetylase 6. *J Biol. Chem.*; 285(46):35759–35769, 2010.
19. Johnson H, Robles M, Kamino H, et al. Trichoepithelioma *Dermatol Online J*;14(10):5, 2008.
20. Karakas B, Bachman KE, Park BH. Mutation of the *PIK3CA* oncogene in human cancers. *British Journal of Cancer*; 94(4):455–459, 2006.
21. Kirby J S, Lucking S M S, Billingsley E M. Trichoblastic Carcinoma Associated with Multiple Familial Trichoepithelioma *Dermatol Surg*;38:2018–2021, 2012.
22. Li ZL, Guan HH, Xiao XM, Hui Y, Jia WX, Yu RX, Chen H, Li CR. Germline mutation analysis in the *CYLD* gene in Chinese patients with multiple trichoepitheliomas. *Genet Mol Res*; 13(4):9650-9655, 2014.
23. Liang YH, Gao M, Sun LD, Liu LJ, Cui Y, Yang S, et al. Two novel *CYLD* gene mutations in Chinese families with trichoepithelioma and a literature review of 16 families with trichoepithelioma reported in China. *Br J Dermatol*;153:1213-5, 2005.
24. Liang YH, Sun CS, Ye XY et al. Novel substitution and frameshift mutations of *CYLD* in two Chinese families with multiple familial trichoepithelioma. *Br J Dermatol*; 158:1156–1158, 2008.
25. Linos K, Schwartz J, Kazakov DV, Vanecek T, Carlson J.A. Recurrent *CYLD* Nonsense Mutation Associated With a Severe, Disfiguring Phenotype in an African American Family With Multiple Familial Trichoepithelioma. *Am J Dermatopathol*; 33(6):640-642, 2011.
26. Lv HL, Huang YJ, Zhou D et al. A novel missense mutation of *CYLD* gene in a Chinese family with multiple familial trichoepithelioma. *J Dermatol Sci*; 50:143–146, 2008.
27. Lv H, Li C, Yan Li, Tang J, Zhang Z. Three Mutations of *CYLD* Gene in Chinese Families With Multiple Familial Trichoepithelioma. *Am J Dermatopathol*; 36(7):605-7, 2014.
28. Matt D, Xin H, Vortmeyer A O, Zhuang Z, Burg G, Boni R. Sporadic Trichoepithelioma Demonstrates Deletions at 9q22.3. *Arch Dermatol*; 136:657-660, 2000.
29. McCalmont T H, Humberson C. Neurotropism in association with desmoplastic trichoepithelioma. *J Cutan Pathol*;39:311-314, 2012.
30. Melly L, Lawton G, Rajan N. Basal cell carcinoma arising in association with trichoepithelioma in a case of Brooke-Spiegler syndrome with a novel genetic mutation in *CYLD* *J Cutan Pathol*;39:977–978, 2012.
31. Mohammadi AA, Seyed Jafari SM. Trichoepithelioma: a rare but crucial dermatologic issue. *World J Plast Surg*.;3(2):142-5, 2014.
32. Nagy N, Farkas K, Kemény L, Széll M. Phenotype-genotype correlations for clinical variants caused by *CYLD* Mutations. *Europ. J. Med. Genet.*; 58:271-278, 2015.
33. Poblete Gutiérrez P, Eggermann T, Höller D, Jugert FK, Beermann T, Gruëndorf-Conen EI, Zeres K, Merk HF, Frank J. Phenotype Diversity in Familial Cylindromatosis: A Frameshift Mutation in the Tumor Suppressor Gene *CYLD* Underlies Different Tumors of Skin Appendages. *J Invest Dermatol*; 119:527-531, 2002.

34. Ponti G, Nasti S, Losi L, et al. Brooke-Spiegler syndrome: report of two cases not associated with a mutation in the *CYLD* and *PTCH* tumor-suppressor genes. *J Cutan Pathol*; 39:366–371, 2012.
35. Qian F, Zhai Y, Yuan X, Li P, Wang W, Ding Y, Wang J, Wu B, Cheng H, Sun L, Yang S, Zhang X. Novel Mutation of *CYLD* Gene in a Chinese Family with Multiple Familial Trichoepithelioma. *Aust Col Dermatol*; 232-234, 2014.
36. Rea SL, Majcher V, Searle MS, Layfield R. *SQSTM1* mutations – Bridging Paget disease of bone and ALS/FTLD Review Article *Exp Cell Res*;325(1): 27-37, 2014.
37. Reuven B, Margarita I, Dov H, Ziad K. Multiple Trichoepitheliomas Associated With a Novel Heterozygous Mutation in the *CYLD* Gene as an Adjunct to the Histopathological Diagnosis. *Am J Dermatopathol*; 35:445–447, 2013.
38. Salhi, A, Bornholdt D, Oeffner F, et al. Multiple Familial Trichopithelioma Caused by Mutations in the cylindromatosis Tumor Suppressor Gene. *Cancer Res*;64:5113-5117, 2004.
39. Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, Silliman N, Ptak J, Szabo S, Yan H, Gazdar A, Powell SM, Riggins GJ, Willson JKV, Markowitz S, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE. High Frequency of Mutations of the *PIK3CA* Gene in Human Cancers. *Science*; 304:554, 2004.
40. Saridaki Z, Koumantaki E, Liloglou G, Papadopoulos O, Zoras O, Spandidos DA. High Frequency of Loss of Heterozygosity On Chromosome Region 9p21-p22 but Lack of p16<sup>INK4a</sup>/p19<sup>ARF</sup> Mutations in Greek Patients with Basal Cel Carcinoma of the Skin. *The J Invest Dermatol*;15(4):719-725, 2000.
41. Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, Forslund K, Heller D, Huerta-Cepas J, Simonovic M, Roth A, Santos A, Tsafou KP, Kuhn M, Bork P, Jensen LJ, Mering C. STRING v10: protein–protein interaction networks, integrated over the tree of life *Nucleic. Acids Research*; (43): 447-452, 2015.
42. Trufant J, Robinson M, Patel R. Brooke-Spiegler syndrome. *Dermatol Online J*; 18(12):16, 2012.
43. Vanecek T, Halbhuber Z, Kacerovska D, Martinek P, Sedivcova M, Carr RA, Slouka D, Michal M, Kazakov DV. Large Germline Deletions of the *CYLD* Gene in Patients With Brooke–Spiegler Syndrome and Multiple Familial Trichoepithelioma. *Am. J. Dermatopathol.*;36:868-874, 2014.
44. Visinoni AF, Lisboa-Costa T, Pagnan NA, Chautard-Freire-Maia EA. Ectodermaldysplasias: clinical and molecular review. *Am J Med Genet A*. 2009 Sep;149A(9):1980-2002. PubMed PMID: 19681154.
45. Volinia S, Hiles I, Ormondroyd E, Nizetic D, Antonacci R, Rocchi M, Waterfield MD. Molecular Cloning, cDNA Sequence, and Chromosomal Localization of the Human Phosphatidylinositol 3-kinase p110 $\alpha$  (*PIK3CA*) Gene. *Genomics*; 24:472-7, 1994.
46. Wooten MW, Geetha Babu TJR, Seibenhener M.L, Peng J, Cox N, Diaz-Meco MT, Moscat J. Essential Role of Sequestosome 1/p62 in Regulating Accumulation of Lys63-ubiquitinated Proteins. *J. Biol. Chem.*; 283:6783-6789, 2008.
47. Wu JW, Xiao SX, Huo J, An JG, Ren JW. A novel frameshift mutation in the cylindromatosis (*CYLD*) gene in a Chinese family with multiple familial trichoepithelioma *Arch Dermatol. Res.*; 306:857–860, 2014.
48. Wang FX, Yang LJ, Li M et al. A novel missense mutation of *CYLD* gene in a Chinese family with multiple familial trichoepithelioma. *Arch Dermatol Res*; 302:67–70, 2010.

49. Yeh I, McCalmont T H, LeBoit P E. Differential expression of PHLDA1 (TDAG51) in basal cell carcinoma and trichoepithelioma Brit J of Dermatol ;167:1106–1110, 2012.
50. Ying ZX, Ma HQ, Liu Y, Xiao SX, Wang YX, Wang GX. A novel mutation of *CYLD* in a Chinese family with multiple familial trichoepithelioma J Europ Acad of Dermatol and Venereol; 26: 1420–1423, 2012.
51. Young AL, Kellermayer R, Szigeti R, et al. *CYLD* mutations underlie Brooke–Spiegler, familial cylindromatosis, and multiple familial trichoepithelioma syndromes. Clin Genet;70:246–249, 2006.
52. Zhang XJ, Liang YH, He PP, Yang S, Wang HY, Chen JJ, Yuan WT, Xu SJ, Cui Y, Huang W. Identification of the Cylindromatosis Tumor-Suppressor Gene Responsible for Multiple Familial Trichoepithelioma. J Invest Dermatol;122:658-664, 2004.
53. Zhao Y, Zeng K. Multiple familial trichoepithelioma: report of a Chinese family not associated with a mutation in the *CYLD* gene and *CYLD* protein expression in the trichoepithelioma tumor tissue. Int J Dermatol; 53:279-281, 2014.
54. Zheng G, Hu L, Huang W et al. *CYLD* mutation causes multiple familial trichoepithelioma in three Chinese families. Hum Mutat; 23:400, 2004.