

**DEFINIÇÃO DO PERFIL DE ALTERAÇÕES DAS
SEQUÊNCIAS DOS GENES *APC*, *CTNNB1*, *WT1*,
WTX E *PLCG2* EM TUMORES DE WILMS**

BRUNA DURÃES DE FIGUEIREDO BARROS

**Tese apresentada à Fundação Antônio
Prudente para obtenção do título de Doutor em
Ciências**

Área de concentração: Oncologia

Orientadora: Dra Dirce Maria Carraro

São Paulo

2012

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Barros, Bruna Durães de Figueiredo

Definição do perfil de alterações das sequências dos genes APC, CTNNB1, WT1, WTX e PLCG2 em tumores de Wilms / Bruna Durães de Figueiredo Barros - São Paulo, 2012.

98p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientadora: Dra. Dirce Maria Carraro

Descritores: 1. TUMOR DE WILMS. 2. GENES DO TUMOR DE WILMS. 3. GENES APC. 4. REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA. 5. RIM.

*“A vida é a arte do encontro, embora haja tanto
desencontro pela vida...”*

Vinícius de Moraes

DEDICATÓRIA

Muitas pessoas entram na nossa vida, aparentemente sem muito sentido, e acabam marcando nossa vida para sempre. Algumas porque vão ajudando no caminho seguido, outras simplesmente por deixá-la mais calma, leve, dançante, apaixonante...

Algumas pessoas nos ajudam a destruir barreiras, nos fazem acreditar em sonhos, nos transformam e nos permite viver a vida de uma outra maneira, jamais imaginada.

Dedico essa tese a vocês.

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos...

À minha orientadora, Dra. Dirce Maria Carraro, pelo aprendizado, pelas oportunidades, pelo incentivo, pela paciência, por todo o apoio e dedicação.

À todas as pessoas do Laboratório de Genômica e Biologia Molecular, fundamentais de tantas formas para o desenvolvimento do trabalho, Elisa, Giovana, Felipe, Tatiana, Carolina, Gustavo, Cris, Mayra, Mabel, Márcia, Roberto, Letícia, Dani, Alex. E também alguns elementos extras companheiros de café e bagunça, Aderbal, Cecília, Fidalguinho, Fran Fran, Iarão, Ju, Anço, Elen, Sol...foram muitas risadas e aventuras!

À Mariana Maschietto por estar sempre disposta em ajudar, por ter me ajudado nos passos iniciais do projeto, quando ainda estava no começo da vida da pesquisa...

Às meninas do Banco de Tumores, Elô, Vera, Bianca, Ana Paula, Lou!

Um obrigada mais do que especial para a Li e a Gi, por me ajudarem em todos os momentos e crises, de projeto, de experimentos, de tese, de baladas, de coração....e não foram poucos!

Às meninas sem noção! Sempre com muitas risadas, dança, amizade, sinceridade, alegria, mesmo sem entender nada do que eu faço....

Ao quarteto fantástico, sempre presente (fisicamente ou não) nos momentos mais importantes dessa jornada, desde a faculdade, festas, viagens, loucuras, fondues, risos, choros....

Aos diversos amigos de todos os meios, faculdade, vida (mesmo os que falam que eu só estudo, não faço nada!), clube, hospital, todos que fazem e fizeram parte da minha vida!

Cris e Gui....sem palavras...muito mais do importantes na minha vida! Saudades sempre!

Ao Centro Internacional de Pesquisa do Hospital A.C.Camargo pela excelente estrutura para o desenvolvimento da pesquisa.

Aos responsáveis pela Pós-Graduação, especialmente Ana Maria Kurinari, Luciane Pitombeira, e Vanuza Barros.

Aos responsáveis pela Biblioteca, Suely e Jefferson pelo apoio na obtenção dos artigos, e pela formatação da tese.

A todas às pessoas que, direta ou indiretamente, me auxiliaram e contribuíram na realização deste estudo. Este trabalho é o resultado de todos vocês!

À FAPESP, pelo suporte financeiro.

Aos meus pais, irmã, cachorra linda, e família, pelo estímulo em aprender, e em me ensinar a querer saber sempre mais, pela dedicação, amor, apoio, e por nunca medirem esforços para a minha felicidade.

RESUMO

Barros BDF. **Definição do perfil de alterações das sequências dos genes APC, CTNNB1, WT1, WTX e PLCG2 em tumores de Wilms.** São Paulo; 2012. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

O tumor de Wilms (TW) origina-se das células precursoras do rim embrionário, e já foram observados eventos comuns a ambos os processos, tumorigênese e nefrogênese. A identificação de alterações moleculares durante esses processos é crucial para entender os eventos desencadeadores do TW. O gene *WT1* codifica para um fator de transcrição com expressão finamente coordenada durante o desenvolvimento do rim, e mutações nesse gene são relatadas em 10% dos TWs esporádicos. Adicionalmente, desregulação no nível de expressão ou mutações de outros genes como a *CTNNB1* também sugerem uma conexão entre TW e nefrogênese. Também são encontradas mutações de *WTX* em alguns casos de TWs. Atualmente, acredita-se que mutações de *WTX*, *WT1* e *CTNNB1* juntas estão associadas a cerca de 30% dos TWs, sendo que mutações gênicas não foram associados para a maioria dos casos. Resultados de um projeto desenvolvido em nosso laboratório apontaram os genes *APC* e *PLCG2* como candidatos a estarem alterados nesse tumor. Nesse estudo anterior, o *APC* foi observado com localização predominantemente nuclear nos TWs, semelhante aos estágios iniciais do desenvolvimento normal do rim, e diferente do rim normal, que apresenta localização citoplasmática. O *PLCG2* foi associado pela primeira vez a uma doença, sendo observada a ausência de marcação proteica na maioria dos TW, semelhante aos estágios iniciais do desenvolvimento, e diferente do rim diferenciado, que apresenta alta expressão da proteína. Com o advento de técnicas modernas de sequenciamento, velozes do ponto de vista de geração de bases e relativamente baratas, tornou-se factível a avaliação de toda a região que abrange o gene a um custo e tempo relativamente baixos. Com isso torna-se viável aplicar o método de sequenciamento de alta performance para avaliação de diversos pacientes. Deste modo o objetivo desse estudo é identificar alterações na sequência genômica completa correspondentes aos

genes *APC*, *CTNNB1*, *WT1*, *WTX* e *PLCG2*, compreendendo uma região de 430Kb, em 15 amostras de TWs e 3 amostras não neoplásicas, usadas como controle, a fim de definir o espectro de mutação desses genes, e avaliar o padrão de alteração nas regiões intrônicas dos genes. Dessa forma, as regiões referentes aos 5 genes do estudo foram cobertas com 60 pares de *primers*, que amplificassem fragmentos de tamanho aproximado de 10 Kb. Após amplificação dos fragmentos nas 18 amostras, todos os produtos foram purificados e quantificados. O passo seguinte foi a confecção de um *pool* de fragmentos de uma mesma amostra, onde quantidades equimolares de cada um dos 60 fragmentos de uma mesma amostra foram unidos. Em seguida foi realizada a construção da biblioteca de um *pool* de fragmentos, onde o *pool* foi digerido enzimaticamente, para se obter fragmentos de tamanhos menores, foi realizada a ligação de adaptadores com *barcodes* únicos, que permite a identificação de cada amostra após corrida de sequenciamento, seguida de uma etapa de amplificação. Foi feito então a confecção de um *pool* de bibliotecas de amostras, nessa etapa, quantidades equimolares de cada biblioteca de amostra foram unidas. Devido ao tamanho da região avaliada e do número de amostras, optamos por realizar 4 corridas de sequenciamento, a fim de se obter uma cobertura boa da região. Desse modo, foram confeccionados 4 *pools* de bibliotecas de amostras. Após analisar as sequências geradas, alinhando-as contra a sequência referência de cada gene, foram encontradas 3 alterações referentes a troca de base, que levava a mudança de aminoácido, sendo 2 delas reportadas no gene *APC*, e uma no gene *PLCG2*. Não encontramos alterações nos genes *WT1* ou *CTNNB1*, mesmo havendo uma porcentagem razoável de casos associados à mutações nesses genes na literatura. Ao avaliar a região intrônica dos genes, observamos que ocorre um padrão de substituição, no caso dos tumores, preferencialmente uma troca G:C>A:T, que difere nos casos controle, sendo a troca A:T>G:C a mais frequente. Dessa forma, podemos observar que existe um padrão na preferência das alterações, possivelmente devido a alguma falha nos mecanismos de reparo nas regiões não codificadas.

SUMMARY

Barros BDF. **[Wilms tumor genomic re-sequencing for evaluating gene loci of *WTX*, *WT1*, *CTNNB1*, *APC* and *PLCG2*]**. São Paulo; 2012. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Wilms tumor (WT) originates from renal precursor's cells from embryonic kidney and common events has been observed in both processes, tumorigenesis and nephrogenesis. The identification of molecular alterations during these processes are crucial to detect the events that triggers WT onset. *WT1* gene transcribes a transcription factor with finely coordinated expression along kidney development and mutations in this gene is reported in 10% of sporadic WTs. Additionally, deregulation at expression level or mutations in other genes, such as *CTNNB1* also suggests a connection between WT and nephrogenesis. Mutations in *WTX* gene is also found in some cases of WTs. Currently, it is estimated that, together, mutations in *WTX*, *WT1* and *CTNNB1* are associated with 30% of WTs, but still for the majority of the cases no mutation is reported. Results from a previous study of our group pointed two other genes, *APC* and *PLCG2*, as candidate genes possibly altered in WTs. In this previous study *APC* was shown to have a predominantly nuclear localization in WTs, similar to the initial steps of normal kidney development and different from mature kidney, where cytoplasmatic localization is detected. *PLCG2* was for the first time associated to a disease, and absence of protein staining was observed for the majority of WT cases, similar to the initial steps of normal kidney development and different from mature kidney, where high expression of the protein was observed. Given the advent of modern technologies of DNA sequencing, which provides faster and cheaper base sequencing, it is feasible to evaluate the complete genomic region spanning the genes at a relatively low costs and time. Therefore, it is possible to apply high-performance DNA sequencing to a large number of patients. In this sense,

the aim of this project is to identify genomic alterations in the complete sequence of *APC*, *CTNNB1*, *WT1*, *WTX* and *PLCG2* genes, spanning a region of 430 kb, in 15 WT samples and 3 non-neoplastic samples, in order to define the mutational spectrum of these genes and evaluate the alteration pattern of the corresponding intronic regions. Thus, the regions corresponding to the 5 genes in this study were covered with 60 pairs of primers, in order to amplify fragments of approximate size of 10 kb. After amplification of all fragments in the 18 samples, all products were purified and quantified. The next step was the construction of a pool of fragments from the same sample, where equimolar amounts of each of 60 fragments of the same sample were placed together. Then library construction from a pool of fragments was performed, where the pool was enzymatically digested to yield fragments of smaller sizes, followed by adapters ligation step, that has unique barcodes, which allows identification of each sample after sequencing run, followed by an amplification stage. It was then done the construction of a pool of libraries of samples, at this stage, equimolar amounts of each sample library were placed together. Due to the size of the region and the number of measured samples, we chose to perform four sequencing runs in order to obtain a good coverage of the region. Thus, four pools of libraries samples were made. After analyzing the sequences generated by aligning them against the reference sequence of each gene, we have identified 3 single base substitutions that lead to amino acid change, 2 reported at *APC* gene and one at *PLCG2* gene. No alteration was observed for the genes *WT1* and *CTNNB1*, even though that is a reasonable number of cases associated to mutations in these 2 genes in the literature. By evaluating the intronic regions of the genes we observed a specific pattern of base substitution. In the case of the tumors, it is mainly detected changes G:C>A:T, that differ from the control cases, where the most frequent substitution is A:T>G:C. Therefore, it is observed a specific pattern of alteration, possibly as a result of a defect in the repair mechanisms at non-coding regions.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Via de sinalização canônica WNT.....	17
Figura 2	Gel de agarose exemplificando a extração de DNA de amostras de pacientes.....	40
Figura 3	Representação do desenho dos <i>primers</i> , utilizados para amplificação dos genes.....	43
Figura 4	Gel de agarose 1% dos fragmentos amplificados.....	44
Figura 5	Confirmação dos fragmentos amplificados por sequenciamento.....	45
Figura 6	Confirmação dos fragmentos por clivagem com enzimas de restrição.....	47
Figura 7	Padrão de tamanhos de fragmentos obtidos após clivagem enzimática utilizando kit Ion Shear™ Plus (Life Technologies), evidenciando a região entre 100 e 400 pb.	49
Figura 8	Etapa de <i>size selection</i>	50
Figura 9	Avaliação da distribuição de tamanho dos fragmentos correspondentes ao <i>pool</i> de 5 pacientes e determinação da molaridade dos fragmentos de tamanho entre 200 e 300pb (delimitados pelas linhas pontilhadas).....	52
Figura 10	Densidade de deposição das <i>Ion Spheres Particles</i> no <i>chip</i> de sequenciamento.....	55

Figura 11	Alinhamento das leituras obtidas pelo sequenciamento na plataforma Ion Torrent contra a sequência genômica.....	61
Figura 12	Validação da alteração por sequenciamento capilar.....	67
Figura 13	Esquema representativo das proteínas dos genes <i>PLCG2</i> e <i>APC</i> a posição dos aminoácidos e os respectivos domínios.....	70
Figura 14	Sequenciamento capilar do <i>hotspot</i> do gene <i>CTNNB1</i>	71
Figura 15	Espectro de substituições de base germinativas (SNPs) presente nas 3 amostras controles (C1, C3 e C4) e nas 15 amostras tumorais.....	73
Figura 16	Frequência e variação dos tipos de substituição somática.....	74
Figura 17	Frequências das substituições de base em SNPs tumorais e substituições somáticas (SS).....	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Avaliação da qualidade da PCR em emulsão e etapa de enriquecimento.....	53
Tabela 2	Número de <i>reads</i> geradas e cobertura para cada corrida de sequenciamento.....	54
Tabela 3	Validação das alterações por sequenciamento capilar.....	65
Tabela 4	Investigação da presença das alterações em um grupo independente de amostras de tumor de Wilms.....	68
Tabela 5	Investigação da presença das alterações em um grupo de 96 amostras de sangue de pessoas não afetadas (grupo controle).....	69
Tabela 6	Número e classificação das substituições de base intrônicas.....	72

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Informações clínicas para as 54 amostras de TWs que foram usadas no estudo.....	27
Quadro 2	<i>Primers</i> desenhados para amplificação dos fragmentos.....	42
Quadro 3	Enzimas de restrição utilizadas para confirmação da identidade de cada fragmento através de digestão enzimática.....	46
Quadro 4	Sequenciamento dos 4 <i>pools</i> na plataforma Ion Torrent.....	56
Quadro 5	Descrição do número e tipo de alteração encontrada para cada amostra em cada gene.....	58

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

° C	Graus Celcius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
BCR	Do inglês, <i>B-cell Receptor</i>
cDNA	Do inglês, DNA complementar ao RNA
Ca²⁺	Cálcio
CEP	Comitê de ética e pesquisa
COG	Do inglês, <i>Children Oncology Group</i>
Cy5	Do inglês, <i>Cyanine 5 dye</i>
DAG	Diacil - glicerol
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EDTA	Do inglês, <i>Ethylene Diamine TetrAcetic Acid</i>
EMT	Do inglês, <i>Epithelial-Mesenchymal Transition</i>
EXO	Exonuclease I
G	gramas
INCA	Instituto Nacional do Câncer
Indels	Do inglês, <i>insertion and deletion</i>
ISP	Do ingles, <i>Ion spheres particles</i>
Kb	Kilo base
M	Molar
Mb	Mega base
MCR	Do inglês, <i>Mutation Cluster Region</i>
MET	Do inglês, <i>Mesenchymal-Epithelil Transition</i>
mL	Mililitro
mM	Milimolar
NCBI	Do inglês, <i>National Center for Biotechnology Information</i>
ng	Nanograma
NWTSG	Do inglês, <i>National Wilms Tumor Study Group</i>

pb	pares de base
pM	Pico mol
PCR	Do inglês, <i>Polimerase Chain Reaction</i>
PNET	Tumor neuroectodérmico primitivo
PKC	Proteína cinase C
mRNA	RNA mensageiro
RPM	Rotações Por Minuto
SAP	Do inglês, <i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i>
SIOP	Do francês, <i>Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique</i>
SNP	Do inglês, <i>Single Nucleotide Polymorphisms</i>
SS	Substituição somática
TW	Tumor de Wilms
TWs	Tumores de Wilms
Units	Unidades

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Formação do rim	2
1.2	Tumores de Wilms.....	3
1.3	Genes mutados em TWs.....	7
1.4	Via de sinalização Wnt	15
1.5	Justificativa	21
2	OBJETIVOS	23
2.1	Objetivo geral	23
2.2	Objetivos específicos.....	23
3	MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1	Comitê de ética.....	25
3.2	Caracterização das amostras	25
3.3	Extração de DNA.....	28
3.4	Desenho de <i>primers</i>	28
3.5	Estabelecimento da metodologia para amplificação dos fragmentos.....	29
3.6	Purificação dos fragmentos dos produtos de PCR	29
3.7	Confirmação das sequências de interesse	30
3.7.1	Tratamento com EXO/SAP e reação de sequenciamento.....	30
3.7.2	Confirmação das sequências através de corte com enzima de restrição.....	31
3.8	Quantificação das amostras	32
3.9	Construção da biblioteca	32
3.10	Preparação das amostras para sequenciamento na plataforma Ion Torrent.....	34
3.11	Sequenciamento das amostras no Ion Torrent.....	35
3.12	Análise das sequências.....	36
3.13	Análise de substituições de bases nas regiões intrônicas	36
3.14	Validação das alterações encontradas.....	38

3.15	Busca das alterações validadas em um grupo independente de amostras.....	39
4	RESULTADOS.....	40
4.1	Extração do DNA e desenho dos <i>primers</i>	40
4.2	Geração dos fragmentos longos.....	43
4.3	Confecção das bibliotecas.....	48
4.4	Preparação das amostras para sequenciamento	51
4.5	Sequenciamento e análise das amostras	53
4.6	Identificação e validação das alterações nas regiões exônicas.....	57
4.7	Busca das alterações validadas em um grupo independente de amostras.....	67
4.8	Análise do padrão de substituições somáticas nas regiões intrônicas ..	71
5	DISCUSSÃO	76
6	CONCLUSÕES	85
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87

ANEXOS

Anexo 1 Tabela com quantificações e volume de cada um dos 60 fragmentos em um dos pacientes, exemplificando os cálculos para chegar à molaridade e volume desejados de cada fragmento antes de dar início à confecção dos *pools* individuais de cada paciente. Esses cálculos foram feitos para todos os pacientes.

Anexo 2 Tabela com todas as alterações encontradas no sequenciamento na plataforma Ion Torrent, juntamente com a porcentagem da alteração encontrada, separadas por gene. Algumas das alterações são encontradas em mais de um paciente.

Anexo 3 Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)

1 INTRODUÇÃO

Dados de incidência mundial mostram que as neoplasias pediátricas representam entre 2% e 3% de todas as neoplasias, sendo que o percentual mediano dos tumores pediátricos observados nos Registros de Câncer de Base Populacional Brasileiros encontra-se próximo de 3%. A estimativa para o ano de 2008 para o Brasil foi de que dos 351.720 casos novos de neoplasias malignas, à exceção dos tumores de pele não melanoma. Para 2010, essa estimativa foi de 9.000 casos novos de neoplasias malignas em crianças e adolescentes até os 18 anos de idade, exceto tumores de pele não melanoma.

Entre os tumores da infância, os tumores renais representam 5 a 10% (LITTLE 1999) dos tumores, sendo que aproximadamente 95% destes são Tumores de Wilms, resultando em uma incidência de uma a cada 10.000 crianças (RIVERA e HABER 2005).

Os tumores embrionários são neoplasias que se originam a partir de células primordiais do mesoderma que sofreram mutações espontâneas, sem a necessidade da ocorrência de alterações secundárias, como ocorre com a maior parte das neoplasias de adultos (DEHNER 1998). Acredita-se ser essa uma das grandes diferenças entre as neoplasias embrionárias e as de adultos. Além disso, os tumores embrionários também mostram morfologias que lembram fases do desenvolvimento do tecido de origem.

Os tumores embrionários diferem dos tumores de adultos em diversos

aspectos tais como características anatomopatológicas, local de acometimento e comportamento clínico (KOESTERS et al. 2003). Dentre os tumores sólidos embrionários, os mais comumente encontrados são os retinoblastomas, hepatoblastomas, neuroblastomas, nefroblastomas, entre os quais se encontram os tumores de Wilms (TW), tumores neuroectodérmicos primitivos (PNET) ou sarcoma de Ewing e os rabdmiossarcomas. Esses tumores mostram diversidade histológica, como é o caso do TW, o qual é objeto de estudo desse projeto.

1.1 FORMAÇÃO DO RIM

A diferenciação normal do rim resulta de eventos moleculares coordenadamente regulados e mutação ou interrupção de qualquer um dos passos cruciais do processo de diferenciação celular pode levar à malformação do rim resultando em diversas doenças, incluindo o câncer (HASTIE 1994; LI et al. 2002).

O rim maduro se forma a partir de interações complexas entre o mesoderma intermediário e o broto uretérico. O broto uretérico induz a condensação do mesênquima, que por sua vez, induz o crescimento e ramificação do broto uretérico, formando assim, os ductos coletores do rim (VAINIO e LIN 2002). No momento da indução iniciada pelo broto uretérico, essas células seguem uma série de eventos morfogenéticos. O mesênquima condensado irá formar as demais estruturas do rim, como as vesículas renais, o corpo em forma de “vírgula” e o corpo em forma de “S”, que por sua

vez, irão dar origem ao glomérulo, e aos ductos proximal e distal do néfron. Sinais são enviados pelo mesênquima para o broto uretérico, para dar início às duas primeiras ramificações do rim.

Entre os genes necessários para o início da formação do rim está o *WT1* (NG_009272), importante na formação e maturação do néfron e na diferenciação e manutenção do glomérulo, com um papel na indução da diferenciação (MOORE et al. 1999; DAVIES et al. 2004).

Insuficiência renal desenvolvida precocemente em alguns pacientes com mutações germinativas de *WT1* sugere que o gene tenha papel importante no desenvolvimento e função renal. Em embriões de camundongos *knockout* para *WT1* o blastema metanéfrico está presente até E10.5, mas entra em apoptose logo após essa idade. Por volta de E12 não é possível detectar células blastematosas e os embriões não apresentam rim (KREIDBERG et al. 1993). Dessa forma, acredita-se que o *WT1* seja importante direta ou indiretamente, para a sobrevivência das células progenitoras.

A expressão de *WT1* é ampla nos componentes em desenvolvimento, e vai se tornando restrita, até que nos rins maduros, passa a ser expresso apenas em podócitos e glomérulos altamente diferenciados (HUFF 2011).

1.2 TUMORES DE WILMS

O TW representa aproximadamente 95% dos tumores pediátricos renais, tendo uma maior incidência entre 3 e 4 anos de idade (BUCKLEY

2011), acometendo 1 em cada 10.000 crianças. A idade média do diagnóstico ocorre entre 43 e 48 meses, sendo entre 90 e 95% dos casos unilaterais, e nos casos de bilateralidade, o diagnóstico é feito cerca de um ano antes dos tumores unilaterais (BRESLOW et al. 1988). Os casos de tumor familiar, aproximadamente 2% dos casos, geralmente estão associados com o aumento da frequência de tumores bilaterais e idade de acometimento menor ao diagnóstico (HUFF 2011).

Duas frentes de tratamento são utilizadas no TW. Uma delas é a utilizada pelo grupo norte-americano, o *National Wilms Tumor Study* (NWTSG), que preconiza cirurgia para determinar o estadió e sua histologia, seguida de quimioterapia. Por outro lado, o grupo europeu, *Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique* (SIOP), utiliza quimioterapia prévia à cirurgia, reduzindo assim, os riscos da mesma. Ambos os grupos apresentam uma taxa de sobrevivência de aproximadamente 90%.

O TW é caracterizado por sua diversidade histológica, sendo descrito como um tumor embrionário trifásico, no qual as células blastematosas, estromais (ou mesenquimais) e epiteliais estão presentes em proporções variáveis com grande diversidade de arranjo arquitetural e graus de diferenciação. O fato da maioria dos casos de TWs serem constituídos de células mesenquimais e epiteliais corrobora com a hipótese de que eles derivam de uma célula precursora renal (MAITI et al. 2000; KUSAFUKA et al. 2002).

Apesar da diversidade histológica, essas células não são diferenciadas e se encontram organizadas de forma aberrante. Em alguns

tumores são observados elementos heterólogos, como músculo liso e cartilagem. Acredita-se, portanto, que o TW seja um tumor de células mesenquimais progenitoras, capazes de se diferenciar de forma aberrante, e que perderam a capacidade de responder aos sinais de controle de crescimento (HUFF 2011).

Por ser um gene importante para o início da formação do rim, a perda da função de *WT1* durante o desenvolvimento renal poderia manter as células precursoras do néfron em um estado multipotente, favorecendo o surgimento do TW. No entanto, eventos adicionais são necessários para que haja a transformação destas células indiferenciadas, levando a um crescimento descontrolado e malignização.

Como histologicamente o TW imita a nefrogênese normal (BECKWITH et al. 1983, 1993; YASHIMA et al. 1998), os genes envolvidos no seu aparecimento podem também estar envolvidos no processo de diferenciação normal do rim. Além do *WT1*, outros genes foram associados ao TW e à nefrogênese, sempre em um baixo número de casos, como o *IGF2* (KREIDBERG et al. 1993; MROWKA e SCHEDL 2000; DOME e COPPES 2002; HARUTA et al. 2008) e *hTert* (YASHIMA et al. 1998).

Além dos aspectos morfológicos, aspectos moleculares do TW também compartilham semelhanças com os primeiros estágios da nefrogênese. Nesse sentido, foi observada uma alta semelhança entre o padrão geral de expressão gênica nos TW e de genes expressos nos primeiros estágios da diferenciação normal do rim, o que fortalece as evidências da conexão entre os dois processos, formação do tumor e

nefrogênese (LI et al. 2002, 2005). Entretanto, esses dados foram baseados no padrão de expressão do tumor como um todo, o que provavelmente não reflete exatamente a relação entre o bloqueio da diferenciação das células do blastema primitivo e o aparecimento do tumor.

Usando uma análise semelhante, um estudo do grupo que avaliou a expressão de aproximadamente 4.600 genes por cDNA *microarray* dos componentes dos TWs, mostrou que preferencialmente o componente blastematoso, e não o tumor como um todo, apresenta o padrão de expressão mais semelhante aos primeiros estágios de desenvolvimento do rim. Esses dados sugerem que o componente blastematoso apresenta a informação molecular que reflete o arrasto na diferenciação das células, conferindo, portanto, uma condição permissiva para o aparecimento do tumor (MASCHIETTO et al. 2008).

Os dados moleculares juntamente com a morfologia desses tumores evidenciam a complexidade molecular da tumorigênese dos TWs e sua relação com a nefrogênese. Devido a essa estreita relação, uma caracterização molecular mais detalhada da nefrogênese em paralelo com o tumor de Wilms, tem sido utilizada em nosso grupo, para buscar alterações precoces que desencadeiem o aparecimento do tumor.

Análises comparativas entre o componente blastematoso de TW e rins não neoplásicos maduros e fetais permitiram a identificação de genes cujo nível de expressão transcricional e proteica foram semelhantes nos primeiros estágios da diferenciação do rim, e no TW. Entre os genes identificados estão *APC* e *PLCG2*, ambos da via de sinalização WNT. O

APC se mostrou mais expresso no tumor em relação a estágios tardios de diferenciação do rim, enquanto que o *PLCG2* se mostrou menos expresso quando submetidos à mesma comparação.

Nesse mesmo estudo, *APC* e *PLCG2* foram avaliados em um *tissue-microarray* com amostras enriquecidas para o componente blastematoso, onde foi observada a perda da expressão proteica de *PLCG2* na maioria (76%) dos casos em TW semelhante aos rins fetais até 18 semanas de idade, enquanto que os rins maduros mostraram forte marcação citoplasmática. A localização proteica do *APC* nos três componentes do TW foi predominantemente nuclear (80%), semelhante aos rins embrionários, enquanto que nos rins maduros, a sua localização foi citoplasmática. Essa positividade nuclear do *APC* pode ser uma evidência de seu envolvimento na tumorigênese dos TWs e adiciona evidências da reativação da via de sinalização WNT nesses tumores (MASCHIETTO et al. 2008).

A recapitulação da expressão dos genes *APC* e *PLCG2* nos estágios iniciais do desenvolvimento do rim no componente blastematoso indica o envolvimento desses genes na diferenciação correta do rim e sugerem fortemente seu papel no surgimento do TW.

1.3 GENES MUTADOS EM TWs

A maioria dos casos de TWs é esporádica, sendo resultado de mutações somáticas, restritas ao tecido tumoral. Existe uma pequena porcentagem que ocorre como consequência de mutações na linhagem

germinativa, podendo ser herdada ou *de novo*. Menos de 10% dos casos de TW estão associados a anomalias congênitas e síndromes, e 1 a 2% estão associados à história familiar, relacionados à herança autossômica dominante com penetrância e expressividade variável (DOME e COPPES 2002).

Alterações em alguns genes já foram associadas ao TW. O *WT1*, localizado em 11p13, foi identificado pela primeira vez em pacientes com a síndrome WAGR que apresentavam deleções no cromossomo 11. O *WT1* codifica um fator de transcrição que pode atuar como supressor tumoral, ou como oncogene, dependendo do contexto em que a célula se encontra, o que sugere que ele desempenhe diferentes papéis no crescimento e desenvolvimento celular (RONG et al. 2006; SUGIYAMA 2010). Ele codifica para um fator de transcrição do tipo *zinc finger*, e apresenta dois sítios de *splicing*, resultando em 4 principais isoformas: com ou sem o éxon 5, que codifica 17 aminoácidos, e proteínas com ou sem os aminoácidos KTS (Lisina, Treonina e Serina, respectivamente), codificados pelos éxons 9 e 10. O mRNA codificado pela variante -KTS atua na ativação transcricional de genes, enquanto que a variante +KTS parece ter um papel pós-transcricional, por se localizar em regiões de *splicing* e se ligar diretamente a fatores de *splicing* (LARSSON et al. 1995; HASTIE 2001; ROBERTS 2005). Ambas as variantes trafegam entre núcleo e citoplasma, onde se ligam a polissomos (NIKSIC 2003; VAJJHALA et al. 2003).

O *WT1* é considerado um gene importante que está envolvido na diferenciação celular. Os efeitos de oncogene ou supressor tumoral do *WT1*

parece ser resultado de como a célula em um determinado estágio de desenvolvimento, responde a perturbações na expressão de outros genes. Sua função parece estar mais relacionada ao contexto e tipo celular, *status* de diferenciação, presença de outros genes alterados, e microambiente (HUFF 2011). Durante o desenvolvimento, *WT1* é expresso em diversos tecidos, preferencialmente nas células que estão no processo de transição epitélio-mesênquima (EMT), ou mesênquima-epitélio (MET), já após o nascimento, o *WT1* está restrito aos podócitos no rim (MOORE 1999).

Apesar da estreita relação entre TW e *WT1*, ao revisar cerca de 500 casos de TW esporádicos relatados na literatura, mutação no gene foi detectada em apenas 5 a 10% dos casos (ZHUANG et al. 1997). A maioria das mutações constitucionais de *WT1* é encontrada em crianças com TW unilateral sem associação com anormalidades do trato genito-urinário. Apesar disso, dois fatores foram associados com a mutação germinativa de *WT1*: idade precoce de acometimento e TW com predomínio do componente estromal (SCHUMACHER et al. 1997).

Foi observado que TWs com mutação em *WT1*, frequentemente apresentam uma expressão bialélica do gene *IGF2* (que por ser um gene que sofre *imprinting* genômico, normalmente apresenta apenas uma cópia do gene ativo), ou mutação de *CTNNB1* (MAITI et al. 2000; KANEDA et al. 2007).

Outro gene já associado ao TW é o *CTNNB1* (NG_013302), que codificada para a β -catenina, um dos principais componentes da via de sinalização WNT (POLAKIS 2000). Ele atua como coativador dos membros

da família TCF/LEF de fatores de transcrição durante o desenvolvimento embrionário, que promove a ativação de genes envolvidos na proliferação e transformação celular (KORINEK et al. 1997). Além disso, tem papel também na adesão célula - célula.

Na maioria dos casos de TW, mutações no gene *CTNNB1* (localizado em 3p22.1), estão localizadas no éxon 3, principalmente no códon 45 (*hot spot*). Um estudo mostrou que mutações neste éxon ocorrem em 50% dos casos onde há mutação concomitante de *WT1*, mas são raras se o *WT1* é selvagem (MAITI et al. 2000), sendo que no geral, mutações no gene codificador da β -catenina são encontradas em aproximadamente 15% dos casos de TWs (KOESTERS, 1999). Mutações seletivas em resíduos de aminoácidos de *CTNNB1* em locais de fosforilação podem resultar em uma forma não degradável da β -catenina, que promove sua desestabilização, passando a se acumular no núcleo, ativando diversos genes envolvidos em proliferação, diferenciação, e genes pertencentes à própria via de sinalização WNT (POLAKIS 2000). Em alguns TWs com mutação em *WT1*, também são encontradas mutações nos éxons 7 e 8 da *CTNNB1*, mas ainda não se sabe quais efeitos essas alterações acarretam (RUTESHOUSER et al. 2008).

Poucas associações entre mutações em diferentes genes foram realizadas, de forma que a frequência de mutação em mais de um gene nos tumores de Wilms, estão mais relacionados à frequência individual de alteração de cada gene, do que a uma combinação de alteração em um grupo de genes. Uma forte associação tem sido observada entre presença

de mutação de *WT1* e *CTNNB1* (HUFF 2011).

Outro gene encontrado alterado em TW, o *WTX* (NG_021345), localizado em Xq11.1, foi recentemente descrito, e é o primeiro gene supressor de tumor identificado no cromossomo X (RIVERA et al. 2007). Pelo fato do *WTX* estar localizado em uma região sujeita à inativação por *imprinting*, homens e mulheres têm apenas uma cópia ativa do gene e, portanto, um único ponto de mutação é suficiente para a inativação do gene (SCHEDL 2007). Essa característica diferencia o *WTX* da inativação da maioria dos genes supressores de tumor que é bialélica (NUSSE 2007). Um estudo feito por RIVERA et al. 2007, mostrou que a perda ou mutação do *WTX* ocorre na mesma frequência em homens e mulheres, sendo que em mulheres, a alteração ocorre preferencialmente no cromossomo X que se encontra ativo, levando à uma inativação completa do gene em ambos os sexos.

O *WTX* codifica uma proteína de 1135 aminoácidos, e apresenta um sítio doador e acceptor de *splice* no éxon 2, resultando uma isoforma com 277 aminoácidos a menos na porção N-terminal da proteína (MAJOR et al. 2007). A proteína completa se localiza na membrana plasmática e citoplasma e tem 3 domínios de ligação para o APC, o que facilita sua interação (GROHMANN 2007; JENKINS et al. 2009). A isoforma menor é encontrada preferencialmente no núcleo (JENKINS et al. 2009; RIVERA et al. 2009).

Foi observado *in vitro*, que *WTX* e *WT1* interagem no núcleo através da região C-terminal, promovendo um aumento da ativação transcricional de

genes alvo mediada por WT1 (RIVERA et al. 2009). Esse dado é sustentado pelo fato dos dois genes apresentarem padrão temporal e espacial de expressão que se sobrepõem durante o desenvolvimento renal (RIVERA et al. 2007).

O padrão temporal de expressão desses genes tem seu início no desenvolvimento renal, apresentando uma expressão completa ao final da semana pós-natal (RIVERA et al. 2007). Um trabalho realizado por GUERTL et al. (2010) propõe que a inativação do *WTX* seja um evento tardio na tumorigênese dos TWs. O *WTX* faz parte de um complexo de destruição, em conjunto com AXINA, APC, GSK-3 β , e outras proteínas, (KIMELMAN e XU 2006), que é responsável por sequestrar a β -catenina do citoplasma bloqueando sua atividade na regulação gênica (Figura 1). O *WTX*, além da degradação da β -catenina, parece estar envolvido também com a distribuição intracelular da proteína APC (WEGERT et al. 2009), e a regulação do sinal da via de sinalização WNT na membrana (TANNEBERGER 2011). Além disso, o *WTX* está envolvido na adesão celular através de interações com o APC e a membrana plasmática (GROHMANN 2007), e na modulação da atividade de WT1 no núcleo (GROHMANN 2007; RIVERA et al. 2009). O aumento da expressão de *WTX* promove o recrutamento do APC para a membrana plasmática, enquanto que a sua perda, leva à associação do APC a microtúbulos.

Para a maioria dos casos é observada a deleção completa do gene, e em alguns casos são encontradas mutações que levam a uma proteína truncada. Não se sabe ainda a função das alterações *missense* encontradas,

uma vez que em muitos casos elas são observadas também no tecido normal do paciente, enquanto que as deleções e proteínas truncadas são vistas apenas no tumor (RIVERA et al. 2007).

Trabalhos anteriores mostraram ausência de mutação em *WTX* na presença de mutação em *WT1*, RUTESHOUSER et al. (2008), no entanto, mostrou que mutações em *WTX* ocorrem na mesma frequência que em *WT1*, e tanto em *WT1* selvagem quanto mutado. Essa variação dos dados pode ser devido a falhas na detecção de mutações de *WT1*, ou pelo fato desse último trabalho buscar mutações também em outras regiões do gene, e não apenas nos sítios mais frequentes (RUTESHOUSER et al. 2008).

Um estudo mais recente (CORBIN et al. 2009) mostrou uma nova categoria de TWs que apresentavam mutação em *CTNNB1*, mas sem mutação ou expressão de *WT1*. A β -catenina tem melhor interação com a porção C-terminal do que com a porção N-terminal de *WTX*, portanto mutações em sua porção C-terminal resulta em maior perda de interação com a β -catenina.

RUTESHOUSER et al. (2008) encontrou em 9% dos casos onde não havia deleção de *WTX*, diminuição ou perda da expressão do gene, mostrando que ele pode ter sido silenciado por alterações epigenéticas, ou mutação em sua região.

Estudos sugerem que mutações de *WTX*, *WT1* e *CTNNB1* juntas explicam por volta de 30% dos TWs (RUTESHOUSER et al. 2008), sendo que para a maioria dos casos, mutações gênicas ainda não foram associadas.

Acredita-se que apenas mutação em *WT1* não seja suficiente para levar à tumorigênese, o que provavelmente deve ocorrer é a perda de função do *WT1* e a ocorrência de uma alteração em um segundo *locus*.

Vários estudos usaram técnicas de citogenética, como estudos alélicos e hibridação genômica comparativa, e sugeriram outras anormalidades genéticas associadas aos TW, incluindo trissomia dos cromossomos 8 e 12, e ganhos ou perdas de regiões cromossômicas tais como: regiões 11p13 (onde está localizado o *WT1*), 11p15 (encontrado em cerca de 3% dos casos de TW esporádicos) (SCOTT et al. 2008), 16q, 1p e 7p (MANNENS et al. 1988; KANEKO et al. 1991; SLATER e MANNENS 1992; STEENMAN et al. 1997). É possível que esses *loci* tenham outros genes importantes para o desenvolvimento do TW, que talvez possam agir *up* ou *downstream* ao *WT1*.

Apesar de existirem casos de TW na síndrome de Li-Fraumeni, na qual mutações de p53 estão associadas, mutações nesse gene são observadas em menos de 5% dos TWs. Estudos têm demonstrado que mutação de p53 está relacionada com histologia desfavorável e pior prognóstico, uma vez que aproximadamente 30% dos tumores com anaplasia apresentam mutação nesse gene. Por imunistoquímica, foi verificado que a proteína está restrita às células anaplásicas, indicando que mutações em p53 estão mais relacionadas com o processo de progressão do tumor do que com seu aparecimento (CHEAH et al. 1996; BIRCH et al. 2001; BENIERS et al. 2001).

1.4 VIA DE SINALIZAÇÃO WNT

A via de sinalização WNT está envolvida em diversos processos biológicos, apresentando um papel chave na embriogênese e no câncer (KLAUS e BIRCHMEIER 2008; MASCHIETTO 2011). As proteínas Wnt são secretadas pelas células e agem através de receptores de membrana podendo ter uma atuação autócrina ou parácrina (WORDAZ 1998). Nas células alvo, essas proteínas regulam diversos processos, tais como, proliferação, sobrevivência e diferenciação celular (KLAUS e BIRCHMEIER 2008). A via de sinalização WNT é dividida em três braços de sinalização celular: a via canônica (ou dependente de β -catenina), a via Wnt/Cálcio, e a Wnt/JNK ou de polaridade planar celular.

Durante a embriogênese, o braço canônico, e mais estudado, encontra-se ativo. A ativação do braço canônico da via WNT depende da interação de um ligante Wnt com o receptor *Frizzled* de membrana e seus co-receptores LR5 ou LR6. A fosforilação subsequente dos co-receptores, mediada por CK α e GSK3 β , recruta as proteínas *Dishevelled* para a membrana, onde por sua vez, interagem com os receptores *Frizzled*, e se polimerizam (BILIC 2006; SCHWARZ-ROMOND et al. 2007), gerando um sítio de ligação para a Axina, que é recrutada para a membrana plasmática, inativando o complexo de destruição (POLAKIS 2007).

A inativação desse complexo permite a translocação da β -catenina livre no citoplasma para o núcleo. No núcleo, a β -catenina passa a exercer seu papel de fator de transcrição, participando de complexos proteicos que

regulam a expressão de diversos genes, tais como o *c-MYC* e *Ciclina D1* (Figura 1A) (HE 1998; TETSU e MCCORMICK 1999). A maioria dos genes alvos da β -catenina estão envolvidos em processos de diferenciação celular, sinalização, adesão, proliferação, e outros genes que regulam a própria via WNT.

Em células diferenciadas, esse braço está inativo e a β -catenina passa a se acumular no citoplasma e na membrana plasmática, participando da adesão célula-célula, onde se liga a e-caderina e outras proteínas. A localização citoplasmática da β -catenina é resultado da sinalização pelo complexo de destruição formado por *GSK3 β* , *AXIN1/2*, *APC* e *WTX*. Por estar livre no citoplasma, a β -catenina é recrutada pelo complexo de destruição, onde é fosforilada por *CKI α* e *GSK3 β* , marcada para ubiquitinação e degradada via proteossomo, pela interação com componentes do complexo de ubiquitina-ligase E3 (ABERLE et al. 1997), mantendo assim, seus níveis dentro da célula (Figura 1B).

Em alguns tumores existem evidências da reativação desse processo onde a β -catenina passa a ter localização nuclear e a exercer seu papel de fator de transcrição.

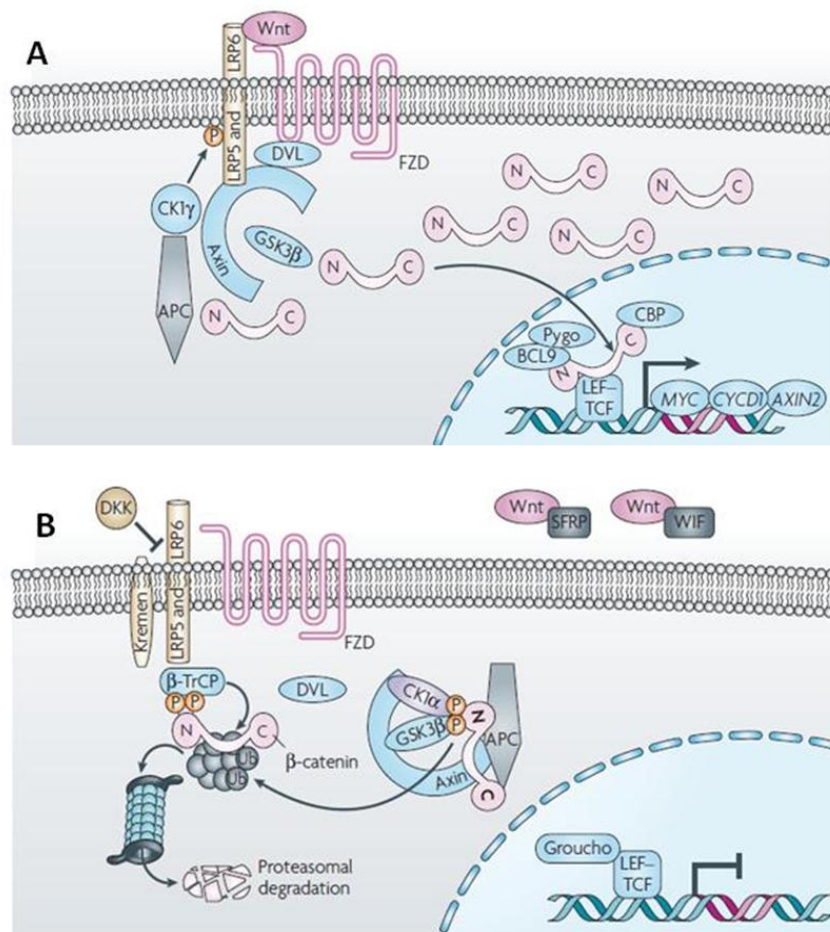


Figura 1 - Via de sinalização canônica WNT. A. Via ativada: Durante a embriogênese a via encontra-se ativada, e essa ativação se dá pela ligação das proteínas da família Wnts ao receptor *Frizzled* que desencadeia uma cascata de eventos, promovendo o transporte da proteína β -catenina livre no citoplasma para o núcleo, onde exerce seu papel de fator de transcrição e participa de complexos protéicos que regulam a expressão de diversos genes, tais como o *c-MYC* e *Ciclina D1*. B. Via não ativada: Em células diferenciadas, a via canônica WNT está desativada, e dessa forma, ocorre um acúmulo de β -catenina no citoplasma e na membrana citoplasmática. Na membrana, ela passa a atuar na adesão célula-célula, ligando-se à e-caderina e outras proteínas, e no citoplasma, é degradada via proteossomo após ser fosforilada e ubiquitinada pelo complexo de destruição formado por GSK3 β , AXIN1, APC e WTX. Modificado de Klaus, 2008.

A via WNT pode ser importante para a transformação neoplásica após sua reativação, como observado em achados onde mutações na β -catenina, que impedem sua fosforilação e proteólise mediada por APC (NG_008481),

são também encontrados em outros tipos de tumores (MUNEMITSU et al. 1995; RUBINFELD et al. 1996). Sugere-se que a via WNT está envolvida na regulação do crescimento celular do mesênquima metanéfrico de onde os TWs se originam (MAITI et al. 2000).

A relação oncogênica entre APC e β -catenina foi inferida após observações de que mutações em algumas regiões da β -catenina, a protegiam da regulação pelo APC (MORIN et al. 1997; RUBINFELD et al. 1997).

Como parte do seu papel na via de sinalização WNT, o APC se move para dentro e fora do núcleo onde interage com a β -catenina, CtBP, e outras proteínas envolvidas na transcrição gênica (Figura 1). A interação do APC endógeno e a β -catenina no núcleo, é fundamental para o controle dos níveis nucleares de atividade da β -catenina (ZHANG et al. 2000), mostrando a importância do gene na ativação da via de sinalização WNT, e as várias formas de regulação que a β -catenina sofre, para evitar a ativação da via em células diferenciadas. Além de promover a degradação da β -catenina no proteossomo (RUBINFELD et al. 1996), o APC promove a exportação da β -catenina nuclear reduzindo a quantidade de β -catenina disponível para se ligar ao complexo de transcrição TCF/LEF (NEUFELD et al. 2000; HENDERSON e FAGOTTO 2002; ROSIN-ARBESFELD et al. 2003), regulando, portanto, negativamente a via de sinalização WNT.

O APC possui dois sinais funcionais de exportação que facilitam sua movimentação entre o núcleo e citoplasma (ZHANG et al. 2000). Essa habilidade é perdida no APC mutado das células tumorais, resultando em

uma falha no transporte da β -catenina, que passa então, a se acumular no núcleo (ROSIN-ARBESFELD et al. 2000).

Alguns fatores que podem explicar a tumorigênese associada a mutações no *APC* são a perda de adesão celular (BIRCHMEIER et al. 1995; BIENZ e HAMADA 2004); a alteração no controle da polaridade e migração, e alteração na estabilização de microtúbulos, que regulam diversos processos, como migração celular e mitose (HANSON e MILLER 2005).

A maioria das mutações no *APC* associadas a tumores ocorre em uma região específica, conhecida como região de *cluster* de mutação (MCR) (BEROUD e SOUSSI 1996). As proteínas truncadas resultantes dessas mutações perdem os domínios necessários para que a β -catenina se ligue.

Por volta de 60% das mutações germinativas descritas do *APC* estão localizadas no último éxon devido, principalmente, ao seu tamanho. Outras mutações estão distribuídas de uma forma relativamente uniforme entre os códons 200 e 1600. As mutações mais descritas são encontradas nos códons 1061 e 1309 (BEROUD e SOUSSI 1996). Aproximadamente 90% dos casos de mutação no *APC* envolvem a introdução de um códon de parada prematuro, decorrentes de mutações *nonsense* ou *frameshift*, levando ao aparecimento de uma proteína truncada (GALIATSATOS e FOULKES 2006).

A primeira relação entre o gene *APC* e carcinomas ocorreu em 1992 quando foi relacionado a uma síndrome familiar de aumento de incidência de carcinomas de cólon (FAP – polipose adenomatosa familiar) (SU 1992; MOSER et al. 1992). Já se sabe que mutações no *APC* é o evento mais

comum nos casos de carcinoma colorretal esporádicos, estando associado com aproximadamente 80% dos casos (McCARTNEY e NÄTHKE 2008). Foi mostrado que metilação aberrante nas ilhas CpG da região promotora, pode atuar como um mecanismo alternativo para mutação na região codificadora do gene (TSUCHIYA et al. 2000).

O *PLCG2* (NG_032019), localizado em 16q24.1, codifica uma proteína cuja expressão foi verificada diminuída ou ausente em um grupo de amostras de TW, sendo associado pela primeira vez com uma doença (MASCHIETTO et al. 2008). Foi observado que esse gene faz parte do braço da via de sinalização WNT que está envolvido com o aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} na célula.

O *PLCG2* faz parte da família fosfoinositol-específico fosfolipase C, é altamente expresso nas células hematopoiéticas, incluindo mastócitos, macrófagos, células B, células NK, entre outras, e atua na formação de PIP3 (fosfatidilinositol-1,4,5-trifosfato) (YU et al. 2005). Sua atuação é mais bem descrita na ativação de linfócitos B, onde após a ligação ao receptor de células B (BCR), uma série de proteínas tirosinas-quinases são fosforiladas. O domínio catalítico de *PLCG2* interage com a membrana celular e hidroliza PIP2, gerando DAG (diacil-glicerol) e IP3 (1, 4, 5 – trifosfato) (HURLEY e GLOBER 1997), o que resulta em um aumento da concentração intracelular de cálcio livre no citoplasma e PKC (proteína quinase C). Dessa forma o *PLCG2* pode ter importante papel no processo de desenvolvimento.

Em um estudo prévio do laboratório, verificou-se a diminuição ou ausência da expressão de *PLCG2*, tanto de mRNA, quanto protéica em TW,

o que pode sugerir um possível envolvimento na formação de, pelo menos, parte desses tumores (MASCHIETTO et al. 2008).

Diversos estudos relacionaram a perda de heterozigose de 16q com o aparecimento do Tumor de Wilms (MAW et al. 1992; SKOTNICKA-KLONOWICZ et al. 2000; MESSAHEL et al. 2009). Perda dessa região é observada em aproximadamente 20% dos casos, e está associada a um pior prognóstico. Essa perda nos leva a crer que genes dessa região são importantes para o desenvolvimento normal do rim. Sendo o *PLCG2* um desses genes, e associados aos dados referentes à perda de expressão obtida pelo nosso grupo, nos fazem crer que ele poderia estar associado ao aparecimento do TW.

1.5 JUSTIFICATIVA

Alterações nos genes *WTX*, *CTNNB1* e *WT1* já foram associadas ao TW, no entanto, alterações nesses genes somam 30% dos casos de TWs, ficando 70% dos casos esporádicos sem mutações gênicas associadas.

Levando-se em consideração os dados obtidos em trabalhos anteriores do nosso grupo, os genes *APC* e *PLCG2* parecem estar envolvidos com os eventos precoces do surgimento do TW.

Mutação no *APC* já foi associada a outros tipos de tumor, sendo responsável por cerca de 80% dos casos de FAP (polipose adenomatosa familiar). O *APC* compreende uma região genômica de 138.919 pb, com grandes regiões intrônicas separando os 16 éxons, que transcrevem um

mRNA de 11.025 pb.

Já foi observada a perda de heterozigose da região 16q em aproximadamente 20% dos casos de TW esporádico, sendo essa a região onde o *PLCG2* está localizado. O *PLCG2* apresenta região genômica de 179.170 pb, separados por 33 éxons, também apresentando regiões intrônicas bastante grandes, e um mRNA de 4.289 pb. Para avaliar as alterações gênicas nos casos de TWs esporádicos da nossa casuística, achamos importante não só avaliar os três genes já previamente associados ao tumor, mas também *APC* e *PLCG2* para se obter um catálogo de mutações gênicas associadas aos TWs.

Com o advento das plataformas de sequenciamento de nova geração e a possibilidade de sequenciar longos trechos do genoma, o nível de caracterização de processos mutacionais presentes nos tumores atingiu um nível anteriormente inviável. Desta maneira, a produção de catálogos de mutações somáticas em genes sabidamente envolvidos na formação de tumores, situadas não somente nas regiões exônicas, mas também nas regiões intrônicas, pode levar a um melhor entendimento sobre os processos de danos no DNA, mutação, reparo e seleção. A geração de catálogos desse tipo pode melhorar a nossa compreensão da causa e desenvolvimento do TW e fornecendo também embasamento para estratégias de prevenção e tratamento (PLEASANCE et al. 2010; NIK-ZAINAL et al. 2012).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Definir alterações na sequência genômica, referente aos genes *WTX*, *WT1*, *CTNNB1*, *APC* e *PLCG2* em amostras de tumores de Wilms e amostras não neoplásicas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Construir bibliotecas de fragmentos das regiões genômicas que abrangem os genes *WTX*, *WT1*, *CTNNB1*, *PLCG2* e *APC* para cada paciente individualmente com inserção de *barcodes*.
- Sequenciar as bibliotecas das amostras na plataforma de sequenciamento paralelo massivo Ion PGM Torrent (Life Technologies) e avaliar a plataforma para identificação de alterações nucleotídicas (inserção, deleção e substituição de base).
- Avaliar as sequências geradas em busca de alterações em relação à sequência genômica dos genes.
- Validar as alterações encontradas no sequenciamento paralelo massivo no mesmo grupo de amostras.
- Rastrear as alterações validadas no sequenciamento paralelo massivo em um grupo independente de amostra tumoral e controle.

- Avaliar o padrão de alterações das regiões intrônicas dos genes do estudo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 COMITÊ DE ÉTICA

O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital A.C.Camargo - Fundação Antônio Prudente, sob número 1142/08 (Anexo 3).

3.2 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

Devido à raridade dos TWs e pelo fato do Brasil adotar o protocolo da *Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique* (SIOP) 2001 para tratamento desses tumores, que preconiza a quimioterapia seguida de cirurgia, raramente são encontradas amostras tumorais sem terem sido submetidas previamente ao tratamento quimioterápico. Em uma tentativa de aumentar o número de amostras sem quimioterapia, foi estabelecida uma colaboração com o *Children Oncology Group* (COG), coordenado pelo Dr. Paul Grundy e Dr. Jeff Dome, cujo tratamento segue o protocolo do *National Wilms Tumor Group* (NWTSG), que preconiza a cirurgia como primeira opção de tratamento. Dessa colaboração estabelecida, foram recebidas 54 amostras de tecido fresco congelado de TW compostas exclusiva ou predominantemente pelo componente blastematoso, onde 15 foram usadas para avaliação detalhada dos genes, e o restante para validação dos

achados. Todas estas amostras foram classificadas clinicamente (EI, EII, EIII e EIV), apresentando ou não recaída tumoral após tratamento quimioterápico (Quadro 1), todas com pelo menos oito anos de seguimento, e colhidas a fresco durante o ato cirúrgico para tratamento de TW. Além disso, foram utilizadas 3 amostras de leucócito como controle.

Quadro 1 - Informações clínicas para as 54 amostras de TWs que foram usadas no estudo.

Amostra	Recaída	Estadiamento final		Amostra	Recaída	Estadiamento final
P001	Não	III		P1068	Não	IV
P031	Não	IV		P1110	Não	IV
P095	Não	III		P1144	Não	IV
P178	Não	IV		P1290	Não	III
P246	Não	III		P4159	Não	III
P396	Sim	IV		P4181	Não	III
P970	Sim	III		P4272	Não	III
P1060	Não	IV				
P002	Sim	III		P1070	Não	IV
P032	Não	III		P1088	Não	III
P117	Sim	IV		P1104	Sim	I
P128	Sim	III		P1108	Sim	II
P201	Sim	III		P1124	Não	III
P219	Sim	III		P1232	Sim	III
P277	Sim	II		P1247	Não	IV
P321	Não	IV		P2050	Não	III
P329	Não	IV		P2063	Não	III
P341	Sim	II		P2081	Não	III
P342	Sim	IV		P2113	Não	IV
P399	Não	III		P2182	Não	III
P420	Sim	III		P4057	Sim	III
P472	Não	IV		P4094	Não	III
P497	Sim	II		P4135	Não	IV
P526	Sim	II		P4196	Não	IV
P575	Não	IV		P4305	Não	III
P697	Sim	II		P6000	Não	III
P1065	Não	III		P6011	Sim	III

3.3 EXTRAÇÃO DE DNA

O DNA das amostras foi extraído pelo método do TRIzol, segundo recomendações do fabricante.

A qualidade do DNA foi avaliada através de gel de agarose, e sua concentração foi medida usando o Nanodrop (Thermo Scientific). O critério para definir a qualidade do DNA é baseado no padrão observado no gel de agarose. O DNA é classificado com excelente quando se observa uma banda única (cerca de 5% das amostras), ótimo quando é visualizado um *smear* com banda (aproximadamente 66% das amostras), e bom, quando é observado apenas um *smear* (aproximadamente 28% das amostras).

3.4 DESENHO DE *PRIMERS*

Para os cinco genes de interesse do estudo, *WTX*, *WT1*, *CTNNB1*, *APC* e *PLCG2*, foram desenhados *primers* a partir da sequência gênica (*WTX*: NM_152424, *WT1*: NM_024426, *CTNNB1*: NM_001098209, *APC*: NM_000038, e *PLCG2*: NM_002661) do DNA genômico disponibilizado pelo *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), para que amplificassem fragmentos longos de aproximadamente 10 Kb, com sobreposição de no mínimo 200 pb.

Para fragmentos refratários a amplificação, novos pares de *primers* foram desenhados, de forma a amplificar fragmentos menores, entre 2 e 5 Kb, priorizando as regiões exônicas, totalizando 60 fragmentos utilizados

para cobrir a região dos 5 genes.

Após serem desenhados, os *primers* foram avaliados pelo programa Oligotech v1.0 sendo utilizados apenas aqueles que apresentassem diferença na temperatura de anelamento menor de 2°C entre os pares, estruturas secundárias ou homodímeros com temperatura de até 10°C.

3.5 ESTABELECIMENTO DA METODOLOGIA PARA AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS

Para a reação de amplificação foram utilizados 0,8 µL de *primer forward* e 0,8 µL de *primer reverse* a 10 mM, 12,5 µL da enzima LongAmp Taq 2X Master Mix (125 units/mL), 1,0 µL de DNA (12,5 ng/µL), e água para completar a reação para um volume final de 25 µL. Para isso, a reação de PCR ocorreu nas seguintes condições: 95°C - 6 minutos, 95°C - 20 segundos, *T_M* - 45 segundos, 65°C - 5 a 13 minutos (de acordo com o tamanho do fragmento. A recomendação do fabricante é de 60 segundos por Kb) [40 ciclos], 65°C - 10 minutos; As reações foram padronizadas com DNA de leucócito de indivíduos normais.

3.6 PURIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS DOS PRODUTOS DE PCR

Para os fragmentos que não apresentavam banda única, foram aplicados 12 µL da reação de PCR em gel de agarose 0,8%, e as bandas de

interesse das amostras controle, foram cortadas a partir do gel de agarose e purificadas utilizando o QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN), de acordo com o protocolo do fabricante. Para checar a recuperação dos fragmentos purificados, uma alíquota dos mesmos foi submetida à eletroforese em gel de agarose 0,8%.

No caso das amplificações realizadas nas amostras dos pacientes, todos os fragmentos foram cortados a partir de gel de agarose e purificados.

3.7 CONFIRMAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS DE INTERESSE

A confirmação do fragmento de interesse após amplificação foi realizado de duas formas, através de sequenciamento capilar, utilizando o método de Sanger, e através de clivagem enzimática.

3.7.1 Tratamento com EXO/SAP e Reação de Sequenciamento

O sequenciamento foi realizado no aparelho ABI 3130xl (Life Technologies), utilizando um dos *primers* usados na amplificação, e as análises foram realizadas utilizando o programa *Sequencing Analysis* 5.3.1.

Para as amplificações que obtiveram banda única, os produtos de PCR foram tratados com 1 unidade de SAP, 1 unidade de EXOI, e tampão de eluição 1 X em reação de 10 μ L. Os produtos tratados ficaram à 37°C por 30 minutos, 80°C por 15 minutos, e em seguida, mantida a 4°C.

Para os fragmentos que tiveram suas bandas purificadas, não foi realizada a etapa de tratamento com EXO/SAP, sendo feita diretamente a

reação de sequenciamento.

Para a realização da reação de sequenciamento, foi utilizada uma quantidade de DNA entre 500 a 800 ng, 0,5 μ M de um dos *primers* utilizados na amplificação, 2 μ L de Big Dye Terminator 3.1, 1 μ L de tampão Save Money 5 X, e água para completar um volume final da reação para 10 μ L. A reação ocorreu na condição: 98°C por 5 minutos, 95°C por 5 minutos, e 50 ciclos a 95°C por 30 segundos, 59°C por 18 segundos, e 60°C por 4 minutos.

Para a precipitação do DNA foram adicionados a reação 1 μ L de acetato de sódio 3 M pH 5.2, 1 μ L de EDTA 125 mM pH 8, 25 μ L de ETOH 100% na temperatura ambiente, e deixado por 15 minutos no escuro. Em seguida, a reação foi centrifugada a 4.000 rpm por 30 minutos à 4°C, seguido de um *spin* invertido. A reação foi então lavada com 35 μ L de ETOH 70% gelado, centrifugada a 4.000 rpm por 30 minutos à 4°C, novamente seguido de *spin* invertido.

Foram adicionados 15 μ L de formamida, e a reação passou por uma desnaturação a 95°C por 3 minutos. A reação foi mantida no gelo até ser sequenciada no equipamento ABI 3130xl (Life Technologies).

3.7.2 Confirmação das sequências através de corte com enzima de restrição

Aproximadamente 2 μ g de DNA foram usados para clivagem enzimática. Foram utilizadas as enzimas *AVAI*, *SacI*, *ECORI*, *Apal*, *BamHI*, *ECORV*, *HincII* e *SphI*. Em cada reação foram usadas 10 unidades da enzima, 1 X de tampão ideal, e água para completar 15 μ L. A incubação foi

de 2 horas na temperatura ótima da enzima (25°C ou 37°C, dependendo da enzima usada), e em seguida foi feita a inativação por temperatura (65°C ou 80°C, de acordo com a enzima).

Para verificar os fragmentos digeridos, 10 µL do produto foi submetido a eletroforese em gel de agarose 0,8%.

3.8 QUANTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS

Após confirmação das sequências nas amostras controles, o DNA dos 15 tumores foram amplificados para os 5 genes, utilizando 50 ou 100 ng de material. Todos os fragmentos foram cortados a partir do gel de agarose e purificados QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN).

Foi realizada a quantificação das amostras que foram amplificadas e purificadas, utilizando o aparelho Qubit® (Invitrogen™), e o kit usado foi o Quant-iT™ dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen™). As amostras foram preparadas de acordo com as recomendações do fabricante.

3.9 CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA

A plataforma Ion Torrent da Life Technologies foi utilizada para o sequenciamento. Essa plataforma permite o sequenciamento de fragmentos de aproximadamente 300 pb.

Para dar início à confecção das bibliotecas individuais de cada tumor, foi realizado um *pool* de fragmentos, no qual todos os 60 fragmentos de um

mesmo tumor ou controle foram unidos de forma equimolar, de maneira a evitar ao máximo a super-representação de algum deles. Para confecção desse *pool* de fragmentos de cada amostra, foi calculado o volume necessário de cada amostra para 0,0007 moles (valor estipulado) baseado no tamanho do fragmento e sua concentração em massa, considerando que 1 mol de 1 pb equivale a 650 g. Em seguida, foi dado início à confecção das bibliotecas de amostra.

A confecção das bibliotecas de amostra foi realizada utilizando o kit Ion Shear™ Plus (Life Technologies), de acordo com o protocolo sugerido pelo fornecedor. Esse protocolo consiste em uma clivagem enzimática por 15 minutos, seguida de purificação através das Agencourt® AMPure® XP Reagent (Beckman Coulter). Logo após a purificação foi corrido um chip de DNA High Sensitivity no Bioanalyzer (Agilent), para verificar se os fragmentos digeridos de cada paciente estavam dentro do tamanho recomendado pelo fabricante.

Após certificar que os fragmentos estavam dentro do intervalo ideal de tamanho, foi dada continuidade a confecção das bibliotecas, sendo a etapa seguinte, a ligação dos adaptadores disponíveis no kit Ion Xpress™ Barcode Adapters (Life Technologies). Após ligação de adaptadores foi feita nova purificação com Agencourt® AMPure® XP Reagent (Beckman Coulter), e em seguida foi realizada a etapa de *size selection* utilizando o E-Gel® (Invitrogen™).

Após o *size selection*, foi feita a amplificação dos fragmentos, utilizando o Ion Plus Fragment Library kit (Life Technologies) segundo

protocolo do fabricante, seguida de nova purificação, obtendo dessa forma, a biblioteca de uma amostra.

Na sequência, corremos outro chip de DNA High Sensitivity (Agilent), a fim de determinar a molaridade dos fragmentos que se encontravam na faixa de tamanho recomendada pelo fabricante (entre 200 e 300 pb) de cada biblioteca de amostra. Uma vez determinado esse valor, foram feitos *pools* equimolares de bibliotecas, juntando bibliotecas de diferentes amostras.

3.10 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA SEQUENCIAMENTO NA PLATAFORMA ION TORRENT

Ao levarmos em consideração o número de amostras e o tamanho da região genômica que estava sendo avaliada, optamos por realizar 4 corridas de sequenciamento, para que obtivéssemos uma cobertura boa da região. Dessa forma, foram feitos 4 *pools* de bibliotecas. Três deles com 5 bibliotecas de tumores ou controles em cada (*pool 1*, *pool 2* e *pool 4*), e uma com 3 bibliotecas de tumor (*pool 3*). Nessa etapa, juntamos as bibliotecas individuais de cada *pool* de maneira equimolar, correu-se outro chip de DNA High Sensitivity (Agilent), dessa vez para determinar qual o fator de diluição necessário para a realização da reação de PCR em emulsão, uma vez que para esta reação, deve-se ter 26 pM de material em 18 μ L da amostra.

Após a etapa de PCR em emulsão, foi feita a quebra da emulsão e o enriquecimento da amostra, separando antes, uma alíquota de 2 μ L. Para verificar se o enriquecimento foi eficiente é feita uma quantificação antes e

depois do enriquecimento. Para tal, usamos 2 μ L do material antes do enriquecimento, e 10 μ L depois do enriquecimento. Essa quantificação é realizada no Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen™), com o Ion Sphere™ Quality Control Kit (Life Technologies), que permite a leitura de das fluorescências emitidas pelos fluoróforos Cy5 e FAM, que são usados para a quantificação no Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen™). A fluorescência FAM, marca o adaptador P1, que está acoplado às Ion Spheres (ISPs – esferas onde os fragmentos estão acoplados), enquanto que o Cy5 marca o adaptador A, que se encontra na extremidade 3' dos fragmentos.

3.11 SEQUENCIAMENTO DAS AMOSTRAS NO ION TORRENT

Uma vez enriquecida, é feita a adição dos reagentes para a reação de sequenciamento paralelo massivo. Para isso, utilizamos o Ion Sequencing 200 Kit (Life Technologies), de acordo com as recomendações do fabricante, que permite o sequenciamento de fragmentos de aproximadamente 200 pb. O sequenciamento é feito em um chip, que pode gerar 10 Mb ou 100 Mb de seqüências, dependendo do escolhido, Ion 314™ Chip ou Ion 316™ Chip, respectivamente. Para o sequenciamento, usamos o Ion 316™ Chip, por gerar um número maior de dados.

O sequenciamento nessa plataforma ocorre de maneira cíclica, sendo baseado na alteração de pH da solução onde ocorre a reação de sequenciamento. Quando há a incorporação de uma base, uma molécula de hidrogênio é liberada, alterando assim, o pH da solução, e permite a

identificação de um sinal dessa pequena alteração pelo software do equipamento.

3.12 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS

Inicialmente as *reads* obtidas no sequenciamento foram mapeadas contra a sequência referência (sequência gênica dos 5 genes do estudo), disponibilizada pelo *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), e analisadas. As sequências obtidas foram avaliadas em busca de alterações apenas na região exônica, utilizando o programa CLCBio *Genomics Workbench*. Buscamos alterações que levasse a alteração de base, promovendo uma troca de aminoácido, e inserção ou deleção, que levasse a uma alteração do código de leitura.

Para realização da análise, foram anotadas as alterações que: a) apresentarem ao menos 50 sequências cobrindo a base alterada, b) tiverem essa alteração em no mínimo 15% das sequências.

3.13 ANÁLISE DE SUBSTITUIÇÕES DE BASES NAS REGIÕES INTRÔNICAS

Foi realizada também uma análise de substituições de bases nas regiões intrônicas.

As alterações de trocas de bases localizadas nas porções intrônicas dos cinco genes investigados foram avaliadas para buscar padrões de substituições somáticas em tumores de Wilms.

Para esta análise, utilizaram-se os dados de trocas de base intrônicas gerados pelo software CLCBio *Genomics Workbench*, excluindo as alterações que apresentassem menos de 20 *reads* e alterações complexas que apresentassem a presença de duas variantes diferentes da base referência.

As alterações presentes nos tumores foram classificadas em duas classes: *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) e Substituições Somáticas (SS). Os SNPs foram definidos como alterações que também estavam presentes em pelo menos um dos indivíduos controles, e por isso representam polimorfismos comuns na população. O restante das substituições intrônicas que estavam presentes nos tumores e não foram reportadas nos controles foram classificadas como substituições somáticas.

Alterações encontradas nos controles (SNPs) e nos dos tumores (SNPs e SS) foram classificados nas seis classes de substituições de base possíveis: (A:T>C:G); (A:T>T:A); (A:T>G:C); (G:C>A:T); (G:C>C:G) e (G:C>T:A).

Para cada amostra foi calculada a frequência de cada classe de substituição e os padrões de tipos de trocas foram comparados entre pacientes e controles.

3.14 VALIDAÇÃO DAS ALTERAÇÕES ENCONTRADAS

Para se ter um melhor entendimento da plataforma utilizada, foram selecionadas apenas algumas alterações encontradas no sequenciamento paralelo massivo nas regiões codificantes, para validação através de sequenciamento capilar. Para isso, foram utilizados *primers* que flanqueassem as regiões alteradas, e fragmentos de aproximadamente 600 pb foram amplificados, utilizando a enzima GoTaq® Green Master Mix (Promega) e em seguida foi realizado o sequenciamento capilar no aparelho ABI 3130xl (Life Technologies), utilizando um dos *primers* utilizados na amplificação, para verificar se essas alterações se confirmavam.

Após realização do sequenciamento, as análises foram feitas utilizando o programa CLCBio *Genomics Workbench*.

Para a reação de sequenciamento os produtos de PCR foram tratados com 1 unidade de SAP, 1 unidade de EXOI, e tampão de eluição 1X em reação de 10 µL. Os produtos tratados ficaram à 37°C por 30 minutos, 80°C por 15 minutos, e em seguida mantida a 4°C.

Para a realização da reação de sequenciamento, foi utilizada uma quantidade de DNA entre 500 e 800 ng, 0,5 µM de um dos *primers* utilizados na amplificação, 1 µL de Big Dye Terminator 3.1, 1,5 µL de tampão Save Money 5 X, e água para completar um volume final da reação para 10 µL. A reação ocorreu na condição: 95°C por 2 minutos, e 40 ciclos a 95°C por 22 segundos, 54°C por 22 segundos, e 60°C por 4 minutos.

Para a precipitação do DNA foram adicionados a reação 1 µL de acetato de sódio 3 M pH 5.2, 1 µL de EDTA 125 mM pH 8, 30 µL de ETOH

100% na temperatura ambiente, e deixado por 15 minutos no escuro. Em seguida, a reação foi centrifugada a 4.000 rpm por 30 minutos à 4°C, seguido de um *spin* invertido. A reação foi então lavada com 30 µL de ETOH 70% gelado, centrifugada a 4.000 rpm por 40 minutos à 4°C, novamente seguido de *spin* invertido.

Foram adicionados 13 µL de formamida, e a reação passou por uma desnaturação a 95°C por 4 minutos. A reação foi mantida no gelo até ser sequenciada no equipamento ABI 3130xl (Life Technologies).

3.15 BUSCA DAS ALTERAÇÕES VALIDADAS EM UM GRUPO INDEPENDENTE DE AMOSTRAS

Foi feita a busca das alterações confirmadas através do sequenciamento capilar, em 39 amostras de TW pertencentes ao mesmo grupo de amostras obtido em colaboração com o COG.

O DNA das 39 amostras foi amplificado utilizando a enzima GoTaq® Green Master Mix (Promega), com os mesmos *primers* utilizados na validação das alterações encontradas no sequenciamento na plataforma Ion Torrent.

As alterações validadas foram testadas em um grupo de 96 amostras de DNA de leucócitos de indivíduos considerados normais para avaliação de sua frequência.

A amplificação dos fragmentos e sequenciamento foi feito da mesma forma que as demais amostras, e as análises foram realizadas utilizando o programa CLCBio *Genomics Workbench*.

4 RESULTADOS

4.1 EXTRAÇÃO DO DNA E DESENHO DOS *PRIMERS*

O DNA de 54 pacientes foi extraído e foram avaliados em gel de agarose 0,8% para verificar sua integridade. Para a maioria das amostras, o DNA apresentou qualidade ótima, como está exemplificado na Figura 2. Esta é uma característica muito importante para amplificação de fragmentos longos.

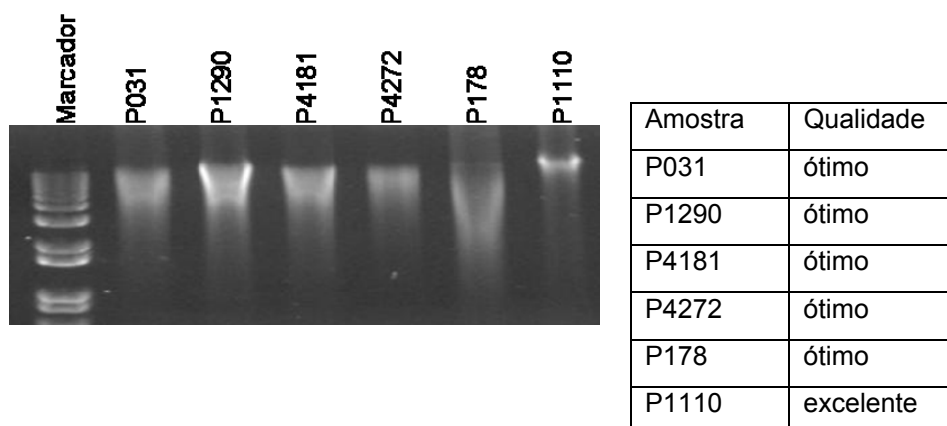


Figura 2 - Gel de agarose exemplificando a extração de DNA de amostras de pacientes.

Para amplificar a sequência completa dos 5 genes do estudo, foram desenhados 42 pares de *primers* que amplificassem um fragmento de aproximadamente 10 Kb, sendo 2 pares para o *WTX*, 5 pares para o *WT1*, 5 pares para a *CTNNB1*, 15 pares para o *APC*, e 15 pares para o *PLCG2*. Os pares de *primers* foram checados no programa PCR *in silico* do UCSC

Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu>), para verificar se alinhavam exclusivamente na região de interesse.

Para 6 fragmentos refratários à amplificação dos fragmentos de 10 Kb, foram desenhados novos *primers* que amplificassem fragmentos menores, de 2 a 5 Kb. Dessa forma, obtivemos no total, 7 pares de *primers* para o *WTX*, 7 pares para o *WT1*, 8 para a *CTNNB1*, 19 pares para o *APC*, e 19 pares de *primers* para o *PLCG2*, totalizando 60 pares de *primers* cobrindo a região genômica dos 5 genes do estudo, como mostra o Quadro 2. O esquema do desenho dos *primers* e o número de fragmentos que cobrem cada genes, estão exemplificados na Figura 3. Alguns fragmentos que representavam a região intrônica e que foram refratários a amplificação, mesmo em tamanho diferente, foram excluídos do estudo.

Quadro 2 - Primers desenhados para amplificação dos fragmentos.

	Primer Forward (T-3)		Primer Reverse (T-3)
WDC 1	gagcctcctgagccag	WDC 1	ctgcctctcctgctgctg
WDC 2	gagcctcctgagccag	WDC 2	cctcctctcctgctgctg
WDC 3.1 A	gagcctcctgagccag	WDC 3.1 A	gagcctcctgagccag
WDC 3.2 C	ctcctcctcctgagccag	WDC 3.2 C	gctcctcctgagccagctg
WDC 3.2 B	ctcctcctcctgagccag	WDC 3.2 B	cctcctcctgagccagc
WDC 3.3	ctcctcctcctgagccag	WDC 3.3	ctcctcctcctgagccag
WDC 3.4	ctcctcctcctgagccag	WDC 3.4	gctcctcctgagccagctg
WT1 1	ctcctcctcctgagccag	WT1 1	cctcctcctgagccagctg
WT1 2a	ctcctcctcctgagccag	WT1 2a	gctcctcctgagccagc
WT1 2b	ctcctcctcctgagccag	WT1 2b	gctcctcctgagccagctg
WT1 3a	ctcctcctcctgagccag	WT1 3a	ctcctcctcctgagccag
WT1 4	ctcctcctcctgagccag	WT1 4	cctcctcctgagccagc
WT1 4a	ctcctcctcctgagccag	WT1 4a	gctcctcctgagccagctg
WT1 4b	ctcctcctcctgagccag	WT1 4b	ctcctcctcctgagccag
CTH91 1	ctcctcctcctgagccag	CTH91 1	gctcctcctgagccagctg
CTH91 2	ctcctcctcctgagccag	CTH91 2	ctcctcctcctgagccag
CTH91 3	ctcctcctcctgagccag	CTH91 3	gctcctcctgagccagctg
CTH91 4	ctcctcctcctgagccag	CTH91 4	gctcctcctgagccagctg
CTH91 4.1	ctcctcctcctgagccag	CTH91 4.1	gctcctcctgagccagctg
CTH91 4.3	ctcctcctcctgagccag	CTH91 4.3	gctcctcctgagccagctg
CTH91 4.4	ctcctcctcctgagccag	CTH91 4.4	gctcctcctgagccagctg
CTH91 6	ctcctcctcctgagccag	CTH91 6	ctcctcctcctgagccag
APC 1.1	gagcctcctgagccag	APC 1.1	gagcctcctgagccag
APC 4	gagcctcctgagccag	APC 4	ctcctcctcctgagccag
APC 1 0	ctcctcctcctgagccag	APC 1 0	ctcctcctcctgagccag
APC 7a	ctcctcctcctgagccag	APC 7a	cctcctcctgagccagc
APC 3 0	ctcctcctcctgagccag	APC 3 0	ctcctcctcctgagccag
APC 4 0	ctcctcctcctgagccag	APC 4 0	gctcctcctgagccagctg
APC 6 0	ctcctcctcctgagccag	APC 6 0	ctcctcctcctgagccag
APC 8 0	ctcctcctcctgagccag	APC 8 0	ctcctcctcctgagccag
2 APC 11a	ctcctcctcctgagccag	2 APC 11 a	cctcctcctgagccagc
APC 11b	ctcctcctcctgagccag	APC 11b	ctcctcctcctgagccag
APC 8 0	ctcctcctcctgagccag	APC 8 0	cctcctcctgagccagc
APC 12 2	ctcctcctcctgagccag	APC 12 2	ctcctcctcctgagccag
APC 12 0	ctcctcctcctgagccag	APC 12 0	gctcctcctgagccagctg
APC 16 A1	ctcctcctcctgagccag	APC 16 A1	ctcctcctcctgagccag
APC 16 01	ctcctcctcctgagccag	APC 16 01	cctcctcctgagccagc
APC 16 2	ctcctcctcctgagccag	APC 16 2	gctcctcctgagccagctg
APC 16 3	ctcctcctcctgagccag	APC 16 3	ctcctcctcctgagccag
APC 16 G1	ctcctcctcctgagccag	APC 16 G1	gctcctcctgagccagctg
APC 16.4 0	ctcctcctcctgagccag	APC 16.4 0	ctcctcctcctgagccag
FLC02 1.3	ctcctcctcctgagccag	FLC02 1.3	cctcctcctgagccagc
FLC02 3	ctcctcctcctgagccag	FLC02 3	gctcctcctgagccagctg
FLC02 3.2	ctcctcctcctgagccag	FLC02 3.2	ctcctcctcctgagccag
FLC02 4	ctcctcctcctgagccag	FLC02 4	cctcctcctgagccagc
FLC02 6	ctcctcctcctgagccag	FLC02 6	ctcctcctcctgagccag
FLC02 6	ctcctcctcctgagccag	FLC02 6	gctcctcctgagccagctg
FLC02 7a	ctcctcctcctgagccag	FLC02 7a	gctcctcctgagccagctg
FLC02 7b	ctcctcctcctgagccag	FLC02 7b	ctcctcctcctgagccag
FLC02 8	ctcctcctcctgagccag	FLC02 8	gctcctcctgagccagctg
FLC02 8	ctcctcctcctgagccag	FLC02 8	cctcctcctgagccagc
FLC02 11	ctcctcctcctgagccag	FLC02 11	cctcctcctgagccagc
FLC02 12a	ctcctcctcctgagccag	FLC02 12a	gctcctcctgagccagctg
FLC02 12b	ctcctcctcctgagccag	FLC02 12b	ctcctcctcctgagccag
FLC02 H.2	ctcctcctcctgagccag	FLC02 H.2	gctcctcctgagccagctg
FLC02 14	ctcctcctcctgagccag	FLC02 14	ctcctcctcctgagccag
FLC02 14	ctcctcctcctgagccag	FLC02 14	gctcctcctgagccagctg
FLC02 M.1	ctcctcctcctgagccag	FLC02 M.1	cctcctcctgagccagc
FLC02 M.2	ctcctcctcctgagccag	FLC02 M.2	gctcctcctgagccagctg

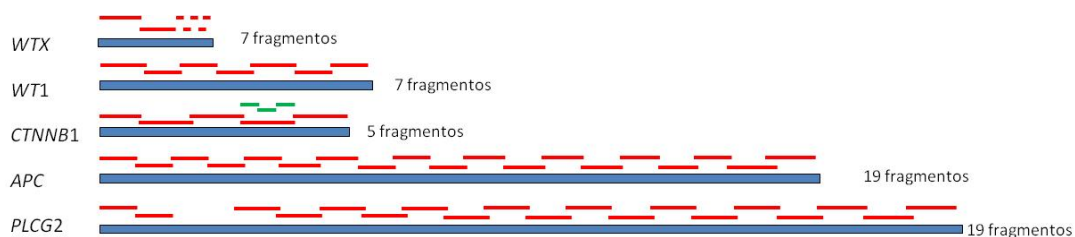


Figura 3 - Representação do desenho dos *primers*, utilizados para amplificação dos genes. Em azul está representada a sequência completa de cada gene, em vermelho, regiões cobertas pelos *primers* desenhados para amplificação dos fragmentos, em verde, região apresentava dificuldade de amplificação em alguns pacientes, e dessa forma, foram desenhados outros *primers* para cobrir essa região nos pacientes refratários.

4.2 GERAÇÃO DOS FRAGMENTOS LONGOS

As reações de PCR foram feitas com a enzima LongAmp Taq2X Master Mix (New England Biolabs) e foram realizadas com PCR *touchdown*. As reações foram padronizadas utilizando DNA genômico extraído de leucócito de indivíduos normais. Foram consideradas reações padronizadas, aquelas que apresentaram no gel de agarose, fragmentos únicos do tamanho esperado, ou aquelas cujo fragmento de interesse se apresentasse de forma mais abundante, mesmo com bandas inespecíficas mais fracas, exemplificado na Figura 4.

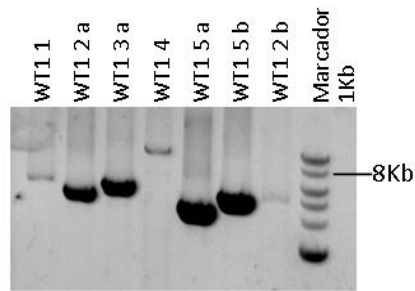


Figura 4 – Gel de agarose 1% dos fragmentos amplificados. Fragmentos padronizados apresentando banda única de tamanho ~8 Kb.

Os fragmentos padronizados que apresentavam amplificação de bandas inespecíficas foram isolados do gel de agarose e purificados.

Para confirmar a especificidade dos fragmentos, estes, após a purificação foram submetidos ao sequenciamento capilar pelo método de Sanger, usando um dos *primers* utilizados na amplificação.

De um total de 60 fragmentos que foram padronizados, que cobrem 70% dos 430 Kb, 51 tiveram suas sequências confirmadas através de sequenciamento. Após os produtos de PCR serem purificados, foi realizada a reação de sequenciamento. A sequência gerada foi alinhada contra a sequência referência genômica, para confirmar a especificidade da sequência, como está exemplificado na Figura 5.

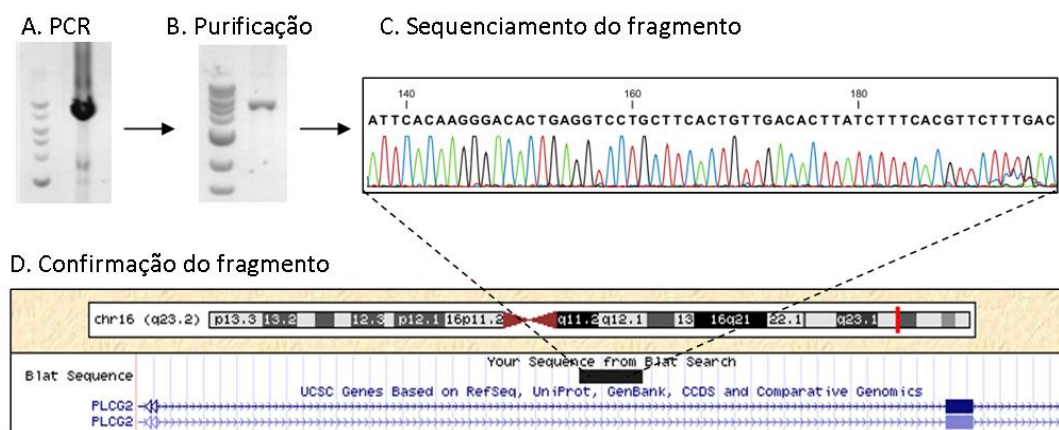


Figura 5 - Confirmação dos fragmentos amplificados por sequenciamento. Exemplo do fragmento intrônico do gene *PLCG2* (fragmento 9). A. Amplificação por PCR. Gel de agarose 1%, do qual a banda específica do DNA controle foi cortada e purificada. B. Produto de PCR purificado. C. Sequenciamento do fragmento. D. Alinhamento da sequência correspondente ao fragmento amplificado contra a sequência referência genômica, usando a ferramenta BLAT (<http://genome.ucsc.edu/>). O mapeamento da sequência do produto de PCR em região intrônica do gene *PLCG2* confirma a identidade do fragmento. A linha vermelha mostra onde o gene está mapeado no cromossomo.

Alguns fragmentos, após serem amplificados e purificados, não mostraram sequência com qualidade satisfatória, não sendo possível a realização da confirmação através do sequenciamento. Dessa forma, para 6 fragmentos, a confirmação foi realizada através de digestão enzimática utilizando enzimas de restrição. Para avaliar quais enzimas seriam mais indicadas para cada fragmento, gerando um padrão de restrição específico, foi utilizada a ferramenta *Neb Cutter* disponibilizada pelo site da *New England BioLabs* (<http://www.neb.com>). Para cada sequência, foram escolhidas uma ou duas enzimas que clivassem os fragmentos de forma a apresentarem um padrão de corte resultante capaz de confirmar sua especificidade. Foi realizada uma clivagem *in silico* conforme está apresentado na Figura 6, para verificar qual o padrão esperado de bandas,

clivagem essa, também realizada através do site da *New England BioLabs*, para que pudesse ser feita uma comparação dos padrões.

Para cada reação enzimática foram utilizados 2 µg de DNA, e as enzimas utilizadas para cada fragmento estão descritos no Quadro 3, juntamente com os tamanhos esperados para cada fragmento após a digestão com as diferentes enzimas.

Quadro 3 - Enzimas de restrição utilizadas para confirmação da identidade de cada fragmento através de digestão enzimática.

Fragmento	Enzima de restrição	Tamanho esperado de banda
WT1 1	<i>EcoRI</i>	7174pb - 2497pb
	<i>SphI</i>	7757pb - 1335pb - 579pb
WT1 4	<i>AvaI</i>	5146pb - 2334pb - 1762pb - 673pb
	<i>SacI</i>	5508pb - 3601pb - 806pb
WT1 5a	<i>EcoRI</i>	5484pb - 581pb
CTNNB1 2	<i>ApaI</i>	5873pb - 1524pb
	<i>SacI</i>	5624pb - 2647pb
CTNNB1 5	<i>BamHI</i>	6152pb - 2184pb
	<i>EcoRV</i>	5894pb - 2442pb
PLCG2 3	<i>HincII</i>	3727pb - 2684pb - 1268pb - 327pb
	<i>SphI</i>	4418pb - 3008pb - 580pb

Para cada fragmento esta descrito a(s) enzima(s) utilizada(s) e os respectivos tamanhos esperados dos fragmentos após digestão.

Cada fragmento foi submetido à restrição com duas enzimas para uma confirmação ainda mais confiável da especificidade do mesmo. Para um dos fragmentos analisados, apenas uma enzima foi utilizada pela dificuldade de encontrar outras enzimas que clivassem a sequência em locais que permitissem um padrão de restrição específico das bandas na hora da visualização em gel.

Um gel de agarose mostrando um exemplo de fragmento confirmado por clivagem enzimática, juntamente com o padrão esperado após digestão *in silico*, e seus respectivos tamanhos esperados após o corte está ilustrado na Figura 6.

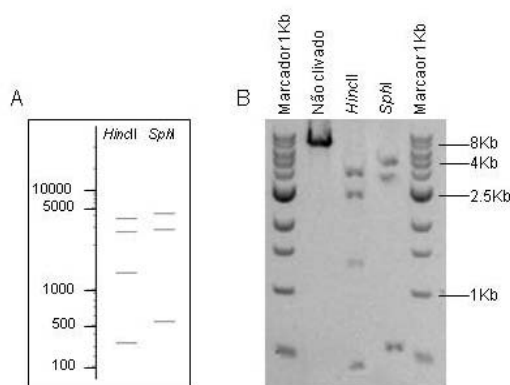


Figura 6 - Confirmação dos fragmentos por clivagem com enzimas de restrição. Exemplo do fragmento 3 do gene *PLCG2*. A. Padrão esperado de fragmentos após digestão com as enzimas *HincII* e *SphI* determinado por clivagem *in silico* com auxílio da ferramenta *NEBcutter*. B. Análise da clivagem do fragmento *PLCG2*. Gel de agarose 1% mostrando o fragmento de 8 Kb antes da clivagem e os fragmentos gerados após a clivagem com a enzima *HincII* (3727 pb, 268 4pb, 1268 pb, 327 pb) e com a enzima *SphI* (4418 pb, 3008 pb, 580 pb).

Uma vez que 57 dos 60 fragmentos tiveram suas sequências confirmadas, a reação de PCR foi realizada para 15 tumores e 3 controles. Para os 3 fragmentos que não puderam ser confirmados, a amplificação nos tumores e controles também foi realizada, uma vez que todos os fragmentos confirmados mostraram ser o de interesse, não havendo casos de amplificação inespecífica.

Após serem amplificados, todos os produtos foram purificados a partir de gel de agarose.

Para avaliar o produto purificado, uma alíquota do fragmento de todos

os tumores foi submetido a nova corrida em gel de agarose 0,8%, onde foi possível observar uma boa recuperação, após esse processo.

Com o objetivo de se obter uma mistura equimolar de todos os fragmentos dos diferentes tumores previamente ao sequenciamento paralelo, as amostras foram quantificadas no aparelho Qubit® (Invitrogen™). A quantificação neste aparelho é altamente sensível e baseado na quantidade de fluorescência emitida. Um intercalante fluorescente como o SYBR ou Pico Green pode ser usado para obtenção de um dado mais preciso por marcar especificamente DNA dupla-fita.

Os dados de quantificação e cálculo para definir a molaridade ideal para dar início à confecção das bibliotecas estão exemplificados no Anexo 1.

4.3 CONFECÇÃO DAS BIBLIOTECAS

Uma vez que todas as amostras seriam sequenciadas em uma mesma corrida, é fundamental que elas apresentassem massas equimolares, a fim de evitar a super-representação de uma região genômica específica em relação a outras regiões da mesma amostra ou regiões genômicas de uma amostra em relação às demais. Primeiramente foi realizado um *pool* equimolar individual de fragmentos de cada um dos 15 tumores e 3 controles. Nessa etapa, unimos todos os 60 fragmentos de cada amostra.

A confecção de cada biblioteca de amostra foi feita separadamente de acordo com o protocolo sugerido pelo sequenciador Ion Torrent (Life

Technologies). Após a clivagem enzimática, espera-se que os fragmentos tenham sido digeridos para o tamanho recomendado (entre 200 e 300 pb), mesmo assim, é realizada uma etapa de checagem no Bioanalyzer (Agilent) para verificação do tamanho dos mesmos. Logo após a purificação, todas as amostras foram corridas em um chip de DNA High Sensitivity no Bioanalyzer (Agilent). A Figura 7 está exemplificando a digestão de 2 das 18 amostras que foram utilizadas. Essa etapa é repetida até que todos os pacientes estejam com os fragmentos dentro do tamanho esperado.

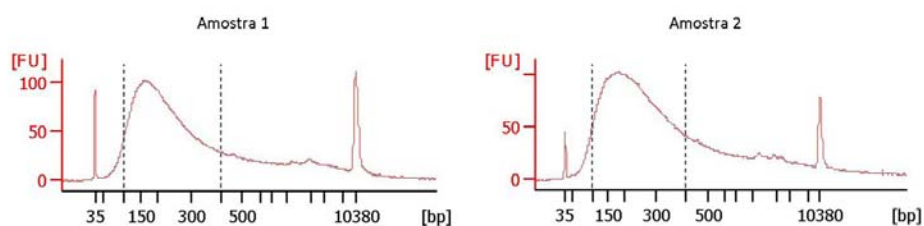


Figura 7 - Padrão de tamanhos de fragmentos obtidos após clivagem enzimática utilizando kit Ion Shear™ Plus (Life Technologies), evidenciando a região entre 100 e 400 pb. Eletroforese capilar em chip DNA High Sensitivity na plataforma 2100 Bioanalyzer.

Após certificar-se que as amostras apresentavam uma maior concentração de fragmentos dentro do intervalo de tamanho ideal (aproximadamente 200 pb), foi dada continuidade a confecção das bibliotecas de amostra, sendo a etapa seguinte, a ligação dos adaptadores individuais. Após essa etapa, foi realizada nova purificação, e em seguida é realizada a etapa de *size selection* para selecionar fragmentos de 200 pb, exemplificado na Figura 8.

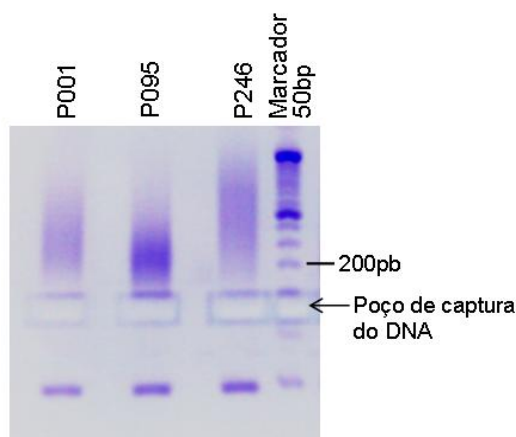


Figura 8 - Etapa de *size selection*. As amostras são aplicadas em um gel de agarose 2% específico para purificação (E-Gel® SizeSelect™ 2% Agarose – Invitrogen), que contém além do poço de aplicação das amostras, um poço de captura que permite a recuperação dos fragmentos de interesse. Através de monitoração contínua da corrida do gel e da aplicação de um marcador de peso molecular (50pb) é possível identificar o momento em que os fragmentos de tamanho determinado estão no poço de captura.

Após a etapa de *size selection*, foi feita uma etapa de amplificação dos fragmentos, seguida de nova purificação. Na sequência, todas as 18 bibliotecas confeccionadas (3 amostras de leucócitos de indivíduos considerados normais e 15 amostras de TW) foram novamente corridas em um chip de DNA High Sensitivity (Agilent). Nessa etapa, é importante determinar a molaridade dos fragmentos que se encontravam dentro da faixa desejada de tamanho de cada amostra, para que fosse possível confeccionar os *pools* de bibliotecas de amostras, que seriam sequenciados em uma mesma corrida.

4.4 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA SEQUENCIAMENTO

Para preparação das amostras para sequenciamento, cada biblioteca de amostra (*pool* de fragmentos de uma mesma amostra) foi cuidadosamente quantificada, e quantidades equimolares foram misturadas para a geração dos *pools* de bibliotecas.

Por uma questão de cobertura desejada, optamos por realizar 4 corridas de sequenciamento. Três delas com 5 amostras em cada, e uma delas com 3 amostras. No total, foram feitos 4 *pools* de bibliotecas. No *pool* 1 foram incluídas as bibliotecas dos pacientes P001, P095, P246, P970 e P1068, no *pool* 2 foram incluídas as bibliotecas dos pacientes P1110, P1144, P4159, P4181 e P4272, o *pool* 3 incluiu as bibliotecas P031, P1290, P178, e finalmente no *pool* 4, foram incluídas as bibliotecas dos pacientes P396, P1060, e dos controles, 1, 3 e 4.

Os 4 *pools* bibliotecas foram submetidos a nova corrida em um chip de DNA High Sensitivity (Agilent), dessa vez para determinar qual a molaridade da região com maior concentração de fragmentos, para calcular o fator de diluição necessário para a realização da reação de PCR em emulsão, uma vez que para esta reação, deve-se ter 26 pM de material em 18 μ L da amostra (exemplificado na Figura 9).

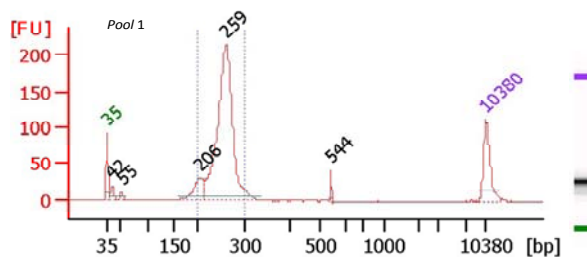


Figura 9 - Avaliação da distribuição de tamanho dos fragmentos correspondentes ao *pool* de bibliotecas de 5 amostras e determinação da molaridade dos fragmentos de tamanho entre 200 e 300pb (delimitados pelas linhas pontilhadas). Eletroforese capilar em chip DNA High Sensitivity na plataforma 2100 Bioanalyzer.

Após determinar o valor equivalente aos 26 pM, foi realizada a reação de PCR em emulsão. Após essa etapa foi feita a quebra da emulsão, separando antes, uma alíquota de 2 μ L para quantificação. O passo após a quebra, consistiu no enriquecimento de cada uma das 4 bibliotecas de amostra que foram sequenciadas. Após o enriquecimento, separamos uma alíquota de 10 μ L para quantificação. Para verificar se o enriquecimento foi eficiente, realizamos uma etapa de controle, quantificando as amostras antes e depois do enriquecimento. As bibliotecas são marcadas com 2 fluorescências, FAM e Cy5, e medidas. A porcentagem entre A/P1 antes do enriquecimento deve ser entre 10 e 30%, e após o enriquecimento, esse valor deve ser maior que 50%. A porcentagem antes do enriquecimento não deve ultrapassar 30%, pois é um indicativo da existência de esferas com mais de um fragmento acoplado (gerando policlonalidade). Apesar de algumas razões ficarem abaixo (*pool* 2) ou acima (*pools* 3 e 4) do recomendado tanto na etapa pré-enriquecimento, quanto na etapa pós-enriquecimento, optamos por dar continuidade ao sequenciamento. Os valores obtidos estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - Avaliação da qualidade da PCR em emulsão e etapa de enriquecimento.

	Porcentagem de ISP com template	
	Pré-enriquecimento	Pós-enriquecimento
<i>Pool 1</i>	14,15	49,84
<i>Pool 2</i>	11,68	34,49
<i>Pool 3</i>	58,39	90,59
<i>Pool 4</i>	52,91	84,58

Os valores de porcentagem entre as esferas (ISPs) com adaptador A (localizado na extremidade 3' dos fragmentos) e adaptador P1 (acoplado as esferas e localizado na extremidade 5' dos fragmentos) estão mostrados para os 4 *pools* avaliados antes e depois do enriquecimento.

4.5 SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE DAS AMOSTRAS

Uma vez enriquecida, é feita a adição dos reagentes para a reação de sequenciamento. O sequenciamento foi feito com o Ion 316™ Chip, que gera em média 100 Mb de sequências.

Obtivemos nas 4 corridas de sequenciamento aproximadamente, 270, 210, 240, e 290 Mb de dados gerados respectivamente, (bem acima do esperado pelo chip) tendo aproximadamente 2 milhões de *reads* em cada corrida, já filtrando as sequências de baixa qualidade e que apresentavam policlonalidade. Esse processo é realizado pelo programa do próprio sequenciador (software V2.0). No sequenciamento referente ao chip mostrado na Figura 10, foram obtidos 70% de deposição de ISPs, sendo 96% delas com fragmentos. Tivemos 38% de esferas policlonais, e 8% com fragmentos de baixa qualidade. Após filtragem dessas *reads*, tivemos um

total de 2.464.533 *reads* para essa corrida de sequenciamento. A Tabela 2 mostra os dados gerados em cada uma das corridas.

Tabela 2 - Número de *reads* geradas e cobertura para cada corrida de sequenciamento.

Corrida de sequenciamento	Número de <i>reads</i> final	Média de cobertura total
<i>Pool 1</i>	2464533	381x
<i>Pool 2</i>	1644628	245x
<i>Pool 3</i>	1543280	257x
<i>Pool 4</i>	1961171	310x

O número de *reads* final é dado após o número total de *reads* gerado ser filtrado para as sequências consideradas de baixa qualidade e policlonais pelo programa do próprio sequenciador.

De forma geral, as 4 corridas foram consideradas de boa qualidade, e com excelente cobertura, variando entre 200 a 400x para cada *pool*.

No Quadro 4, estão descritas o número de sequências geradas para cada *pool* de bibliotecas em cada corrida de sequenciamento, e separadas por amostra, tumor e controle, mostrando a porcentagem de cobertura obtida para cada tumor. Podemos observar que o número de *reads* obtidas para cada amostra foram próximos, mostrando que não houve uma super-representação de nenhuma amostra no sequenciamento, confirmando a importância da etapa inicial de quantificação dos fragmentos e cálculo de molaridade.

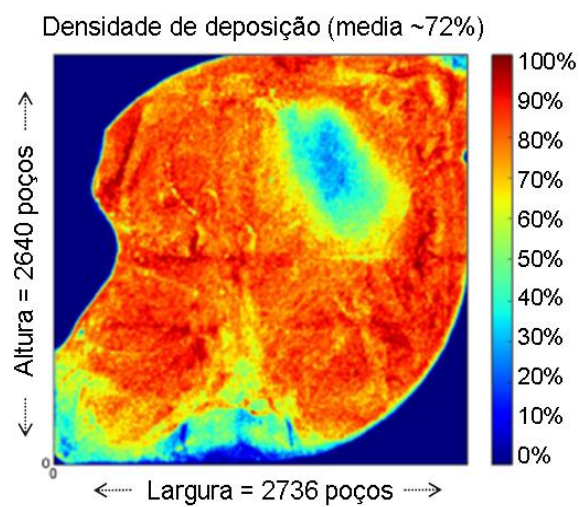


Figura 10 - Densidade de deposição das *Ion Spheres Particles* no *chip* de sequenciamento. A porcentagem de deposição em cada região do *chip* esta representada por uma escala de cor onde as regiões em laranja e vermelho apresentam alta densidade.

Quadro 4 - Sequenciamento dos 4 *pools* na plataforma Íon Torrent.

Amostras	Sequências obtidas	Sequências filtradas	Volume de dados gerados (Mb)	% de <i>reads</i> encontradas em cada tumor
<i>Pool 1</i>	4235932	2464533	270.06	
P001		497243		20,18
P095		597360		24,24
P246		573232		23,26
P970		430278		17,46
P1068		346445		14,06
<i>Pool 2</i>	3819500	1644628	209.37	
P1110		379704		23,09
P1144		409810		24,92
P4159		284598		17,30
P4181		201307		12,24
P4272		347838		21,15
<i>Pool 3</i>	4858462	1543280	239.28	
P031		365347		23,67
P1290		370609		24,01
P178		378033		24,50
X		370792		24,03
<i>Pool 4</i>	5231291	1961171	294.75	
P396		362441		18,48
P1060		426915		21,77
C1		415907		21,21
C3		326412		16,64
C4		395498		20,17

A tabela mostra o número total de sequências geradas em cada corrida e o número de sequências obtidas após os filtros para eliminar sequências de baixa qualidade e sequências policlonais com o número total de bases correspondentes. A quantidade de sequências identificada para cada paciente esta discriminada, assim como a porcentagem referente à *reads* totais obtidas em cada corrida de sequenciamento.

As sequências obtidas foram mapeadas contra a sequência referência (sequência gênica dos 5 genes do estudo - WTX: NG_021345, WT1: NG_009272, CTNNB1: NG_013302, APC: NG_008481, PLCG2: NG_032019), disponibilizada pelo *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), e analisadas.

4.6 IDENTIFICAÇÃO E VALIDAÇÃO DAS ALTERAÇÕES NAS REGIÕES EXÔNICAS

As análises das regiões correspondentes aos éxons foram realizadas utilizando o programa CLCBio *Genomics Workbench*, em busca de substituições de base que levassem a uma troca de aminoácido; inserções e/ou deleções. Para todas as 18 amostras, as sequências obtidas foram avaliadas em busca de alterações, conforme descritas no Quadro 5.

Quadro 5 - Descrição do número e tipo de alteração encontrada para cada amostra em cada gene.

Paciente	Gene	Alteração de base	Deleção de base	Inserção de base
P001	WTX	0	2	0
	WT1	0	1	0
	CTNNB1	1	1	1
	APC	1	4	0
	PLCG2	0	1	0
P095	WTX	0	3	0
	WT1	0	1	0
	CTNNB1	1	1	0
	APC	1	3	0
	PLCG2	0	1	0
P246	WTX	0	3	0
	WT1	0	0	0
	CTNNB1	0	0	0
	APC	0	4	0
	PLCG2	0	2	0
P970	WTX	0	4	0
	WT1	0	1	0
	CTNNB1	0	1	0
	APC	2	3	0
	PLCG2	1	2	0
P1068	WTX	0	4	0
	WT1	0	0	0
	CTNNB1	0	1	0
	APC	1	3	1
	PLCG2	0	3	0
P1110	WTX	0	6	0
	WT1	0	1	0
	CTNNB1	0	2	0
	APC	2	1	0
	PLCG2	1	0	0
P1144	WTX	0	4	0
	WT1	0	1	0
	CTNNB1	0	1	0
	APC	2	2	1
	PLCG2	0	4	0
P4159	WTX	0	6	0
	WT1	0	1	0
	CTNNB1	0	1	0
	APC	1	3	0
	PLCG2	0	0	0
P4181	WTX	0	2	0
	WT1	0	1	0
	CTNNB1	0	2	0
	APC	1	3	0
	PLCG2	1	1	0
P4272	WTX	0	0	0
	WT1	0	1	0
	CTNNB1	0	0	0
	APC	1	3	0
	PLCG2	0	3	0

Cont./ Quadro 5

Paciente	Gene	Alteração de base	Deleção de base	Inserção de base
P031	WTX	0	20	0
	WT1	0	4	0
	CTNNB1	0	4	0
	APC	1	9	0
	PLCG2	0	5	0
P1290	WTX	0	13	0
	WT1	0	3	0
	CTNNB1	0	3	0
	APC	1	11	0
	PLCG2	0	3	0
P178	WTX	0	10	0
	WT1	0	3	0
	CTNNB1	0	3	0
	APC	2	7	0
	PLCG2	0	6	0
P396	WTX	0	11	0
	WT1	0	2	0
	CTNNB1	0	2	0
	APC	1	7	1
	PLCG2	0	5	0
P1060	WTX	0	12	0
	WT1	0	4	0
	CTNNB1	0	1	0
	APC	1	5	0
	PLCG2	0	3	0
C1	WTX	0	11	0
	WT1	0	2	0
	CTNNB1	0	6	0
	APC	1	5	1
	PLCG2	0	7	0
C3	WTX	0	14	0
	WT1	0	2	0
	CTNNB1	0	1	0
	APC	1	9	0
	PLCG2	0	4	0
C4	WTX	0	14	0
	WT1	0	2	0
	CTNNB1	0	2	0
	APC	2	6	0
	PLCG2	1	3	0

Apenas as alterações do tipo substituição de base que acarretam em alteração de aminoácido estão apresentadas.

Foi detectado uma alta proporção de deleções de uma única base, sendo que algumas delas foram encontradas em mais de uma amostra. No total foram detectadas 375 alterações, sendo 28 trocas de base (sendo uma delas um polimorfismo comum do *APC* já descrito, e que estava presente em quase todos os tumores), sendo 8 alterações únicas, 5 inserções, sendo 4 alterações únicas, e 342 deleções de uma base, sendo 82 alterações únicas, obtendo em média de 20,8 alterações por paciente.

Obtivemos uma cobertura média das alterações reportadas nos tumores e controles de 174x quando consideramos todas as alterações encontradas nos 5 genes, o que é considerado ótimo, e uma cobertura média de 220x, quando levamos em conta apenas as alterações que promovessem uma troca de aminoácido, ou levasse a uma alteração no código de leitura da proteína, também considerado excelente.

Uma descrição detalhada de todas as alterações encontradas estão descritas no Anexo 2.

Para uma análise geral dos dados gerados pela plataforma Ion Torrent, e a fim de se ter uma melhor compreensão e entendimento da plataforma utilizada, foram selecionadas apenas algumas alterações para validação. Foi estabelecido como critério para seleção das alterações para serem validadas, aquelas alterações que apresentassem mais de 50 *reads* cobrindo a base alterada, e ausência da alteração no controle do sequenciamento paralelo massivo. Foram selecionadas 30 alterações para validação, das quais 18 reportam a deleção de uma base, quatro reportam a inserção de uma base, e oito reportam substituições de uma base que levam

a uma troca de aminoácido. Como foram encontrados poucos casos de inserção ou troca de uma base, optamos por validar todas elas, a fim de ter uma melhor compreensão das limitações e vantagens dessa nova plataforma, e sua confiabilidade. Entre as 18 alterações que levam a deleção de uma base, 10 foram reportadas tanto por *reads* que mapeiam no sentido senso quanto por *reads* que mapeiam no sentido antisenso em relação à sequência genômica (Figura 11A); e 8 alterações foram reportadas por *reads* que mapeiam em apenas um dos sentidos (senso ou antisenso) em relação à sequência genômica (Figura 11B).



Figura 11 - Alinhamento das leituras obtidas pelo sequenciamento na plataforma Ion Torrent contra a sequência genômica. As sequências em vermelho representam leituras alinhadas no sentido senso e as sequências em verde representam leituras alinhadas no sentido antisenso. A. Exemplo de uma alteração reportada por leituras que alinham nos dois sentidos, senso e antisenso. B. Exemplo de uma alteração reportada por leituras que alinham apenas no sentido antisenso. As setas indicam a posição da alteração encontrada.

Para amplificação das regiões com as alterações encontradas, foram utilizados *primers* que flanqueavam a alteração e que amplificavam fragmentos de aproximadamente 600 pb. Em seguida foi realizado o sequenciamento capilar.

Os dados mostraram que não foi possível validar nenhuma das 22 alterações que reportavam deleção ou inserção de uma base. Como não foi possível validar nenhuma dessas alterações independentemente se a mesma se encontrava em uma região de homopolímero, constatamos que a plataforma Ion Torrent não gera dados confiáveis de *indels* (inserções e deleções). Assim, nós optamos por não continuar a validação desse tipo de alteração para os demais casos encontrados.

Quanto aos casos de substituição de base, das 8 alterações selecionadas, 6 tiveram a confirmação da alteração, como está exemplificado na Figura 12. É importante mencionar que as 2 alterações que não foram validadas, apresentavam apenas 4 e 10 *reads* cobrindo a base alterada, enquanto que as demais, apresentavam uma média de 560 *reads* cobrindo a alteração. Isso sugere que a plataforma Ion Torrent é ideal para detecção de alterações de substituição de base.

Das 6 alterações validadas, 4 foram encontradas no gene *APC* e 2 delas no gene *PLCG2*. Como inicialmente todos os casos de substituição de base foram selecionados para validação, nessa etapa, duas dessas alterações foram descartadas, pois foram reportadas em um dos controles no sequenciamento massivo na plataforma Ion Torrent, sendo esse um critério de exclusão para buscar as alterações em um grupo independente

de amostra.

Seguimos portanto, em 4 alterações para validação independente. As alterações selecionadas, juntamente com os dados de validação e frequência encontrada na população estão descritas na Tabela 3.

As alterações validadas foram consultadas nos bancos de dados 1000 genomes e no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) *SNP database* (dbSNP), para investigar se se tratavam de polimorfismos comuns, diminuindo assim o risco de ser patogênica. Para 3 das 4 alterações (Met1413Val, Gly2502Ser, identificadas no *APC*, e Asn946Ser, identificada no gene *PLCG2*) havia relato nos bancos de dados (1000 genomes e dbSNP). A alteração encontrada no gene *APC*, Ile2541Val, não está descrita nos mesmos bancos investigados.

A alteração Met1413Val (*APC*) foi encontrada em um paciente em heterozigose, e a frequência da alteração na população descrita nos bancos de dados é de 0,001, sendo considerada uma alteração rara. Uma avaliação dos efeitos que a alteração encontrada pudesse ter na estrutura proteica, foi realizada nos programas de predição de patogenicidade baseado em estrutura (SIFT e PolyPhen), que classificou a mesma como sendo tolerada ou benigna.

A alteração Gly2502Ser (*APC*) foi encontrada em 2 pacientes em heterozigose. A frequência da alteração na população descrita nos bancos de dados é de 0,008, e após avaliação da possível alteração da estrutura proteica pelos programas de predição (SIFT e PolyPhen), ela foi classificada como sendo tolerada ou benigna.

A alteração Ile2541Val (*APC*) foi encontrada em um paciente em heterozigose. Essa alteração não está descrita nos bancos de dados, não tendo, portanto, nenhuma frequência associada. Ao avaliarmos essa alteração em relação aos efeitos na estrutura proteica, verificamos que ela também foi classificada como tolerada ou benigna pelos programas de predição.

A alteração Asn946Ser (*PLCG2*) foi reportada em um paciente, também em heterozigose. Por ser um gene pouco estudado, mesmo a alteração estando descrita nos bancos de dados, nenhuma frequência populacional foi associada à mesma. A avaliação do possível efeito da alteração na estrutura da proteína classificou a mesma como tolerada ou benigna.

Tabela 3 - Validação das alterações por sequenciamento capilar.

Gene	Alteração	Troca	Amostra	% observada no Ion Torrent	Validação	Status alélico	% observada no seq capilar	Frequência na população*	Predição de patogenicidade (SIFT/Polyphen)
WTX	Arg51fs	153delG	P246	35,7	Não				
	Arg51fs	153delG	P396	38,8	Não				
	Gly552fs	1656delG	P1290	40,6	Não				
	Gly552fs	1656delG	P178	42,3	Não				
	Val968fs	2904delG	P1110	35,3	Não				
	Val968fs	2904delG	P4159	36,0	Não				
	Ser514fs	1542delC	P178	38,0	Não				
	Ser514fs	1542delC	P1060	47,2	Não				
Lys12fs	36delG	P1060	46,4	Não					
WT1	Leu515fs	1545delG	P031	49,0	Não				
	Leu515fs	1545delG	P178	38,1	Não				
	Arg389fs	1167delC	P031	36,0	Não				
	Arg389fs	1167delC	P178	45,9	Não				
CTNNB1	Gly616fs	1848delG	P178	37,8	Não				
	Gly616fs	1848delG	C3	45,0	Não				
	Ser718fs	2154insT	P001	2,0	Não				
	Gln92Arg	A>G	P095	40,0	Não				
	Met763Val	A>G	P001	50,0	Não				
APC	Ser1419fs	4257delC	P001	37,1	Não				
	Ser1419fs	4257delC	P970	34,9	Não				
	Ans641fs	1924insA	P1068	40,0	Não				
	Ala597fs	1791insT	P396	42,9	Não				
	His33fs	99insT	P1144	40,0	Não				

Cont/ Tabela 3

PLCG2	Met1413Val	A>G	P970	46,3	Sim	Hetero	50	0,001 (A/G)	Tolerada/benigna
	Arg2525His	G>A	C4	44,9	Sim	Hetero	50	1 descrição ¹	Tolerada/provavelmente danosa
	Gly2502Ser	G>A	P1110	45,6	Sim	Hetero	50	0,008 (19/2169)	Tolerada/benigna
	Gly2502Ser	G>A	P1144	45,9	Sim	Hetero	50	0,008 (19/2169)	Tolerada/benigna
	Ile2541Val	A>G	P178	47,7	Sim	Hetero	50	não descrita	Tolerada/benigna
	Asp998fs	2994delC	P246	35,1	Não				
	Asp998fs	2994delC	P031	44,6	Não				
	Pro171fs	513delC	P1290	37,1	Não				
	Pro171fs	513delC	P178	40,9	Não				
	Ile796fs	2388delC	P1068	41,2	Não				
	Ile796fs	2388delC	P1290	46,2	Não				
	Gly866fs	2598delA	P1144	37,0	Não				
	Gly866fs	2598delA	P4272	35,9	Não				
	Trp646fs	1938delG	P1068	35,8	Não				
	His244Arg	A>G	P970	88,2	Sim	Homo	90	0,02 (42/2188)	Tolerada/benigna
	His244Arg	A>G	P1110	43,1	Sim	Hetero	50	0,98 (2146/2188)	Tolerada/benigna
	His244Arg	A>G	C4	66,7	Sim	Hetero	50	0,98 (2146/2188)	Tolerada/benigna
	Asn946Ser	A>G	P4181	44,4	Sim	Hetero	50	Sem frequência descrita	Tolerada/benigna

* (n alelo mutado/n total)

¹ classificação LOVD - não descrito no dbSNP ou 1000 genomes

SIFT classifica a alteração com sendo tolerada ou afeta a função protéica

PolyPhen classifica as alterações como benigna, possivelmente danosa, ou provavelmente danosa

As alterações encontradas para cada gene estão apresentadas indicando a alteração em nível de nucleotídeo e a respectiva alteração na proteína. % observada no Ion Torrent - porcentagem de leituras reportando a alteração em relação ao total de leituras que cobrem a base, pelo sequenciamento na plataforma Ion Torrent. Validação – confirmação da alteração por sequenciamento capilar. Status alélico – identificação da alteração em homozigose ou heterozigose pelo sequenciamento capilar. % observada no sequenciamento capilar – porcentagem da alteração observada por sequenciamento capilar. Frequência na população – frequência da alteração observada na população descrita nos bancos de dados dbSNP e 1000 Genomes. Patogenicidade da alteração – predição de patogenicidade das alterações por análises *in silico* nos programas de predição Sift e Polyphen.

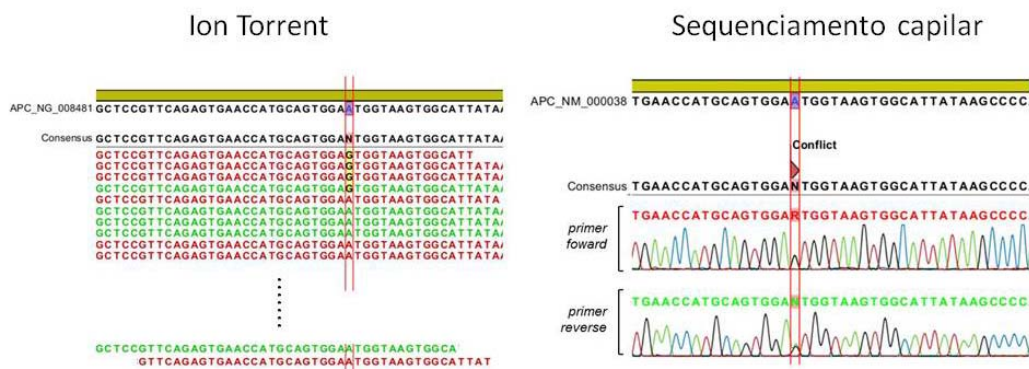


Figura 12 - Validação da alteração por sequenciamento capilar. Exemplo de uma alteração no gene *APC*. A. Identificação da alteração de troca A>G na posição 4322 da região transcrita do gene *APC* pelo alinhamento das sequências obtidas na plataforma do Ion Torrent (sequências em vermelho e verde) contra a sequência genômica do gene *APC* (NG_08481). B. Confirmação da alteração por sequenciamento capilar, tanto pelo sequenciamento com o *primer forward* quanto com o *primer reverse*. A presença de sequências reportando a base A e sequências reportando a base G pelo sequenciamento no Ion Torrent e a presença de pico duplo no sequenciamento capilar indicam que a alteração está em heterozigose no tumor do paciente.

4.7 BUSCA DAS ALTERAÇÕES VALIDADAS EM UM GRUPO INDEPENDENTE DE AMOSTRAS

As 4 alterações validadas foram investigadas em 39 amostras adicionais de TW.

O DNA das 39 amostras foi amplificado utilizando a enzima GoTaq® Green Master Mix (Promega), com os mesmos *primers* utilizados para a validação das alterações encontradas no sequenciamento na plataforma usada pelo Ion Torrent.

A alteração Gly2502Ser no gene *APC*, foi também encontrada em 2 pacientes do grupo de validação, como mostra a Tabela 4.

Tabela 4 - Investigação da presença das alterações em um grupo independente de amostras de tumor de Wilms.

Gene	Troca	Alteração	Paciente	Status alélico	Frequência na população*	Patogenicidade da alteração encontrada
APC	A>G	Met1413Val	-			
	G>A	Gly2502Ser	P526, P002	Hetero	0,008 (19/2169)	Tolerada/benigna
	A>G	Ile2541Val	-			
PLCG2	A>G	Asn946Ser				

As alterações investigadas no grupo independente de amostras estão apresentadas indicando a alteração em nível de nucleotídeo e a respectiva alteração na proteína. Paciente no qual alteração foi encontrada. *Status* alélico – identificação da alteração em homozigose ou heterozigose pelo sequenciamento capilar. Frequência na população – frequência da alteração observada na população descrita nos bancos de dados dbSNP e 1000 Genomes. Patogenicidade da alteração – predição de patogenicidade das alterações por análises *in silico* nos programas Sift e Polyphen.

Para verificar se as alterações encontradas são polimorfismos comuns, fomos buscar essas alterações em um grupo de 96 amostras de DNA de leucócitos de indivíduos considerados normais.

Das 4 alterações buscadas no grupo controle, somente uma delas, a alteração Gly2502Ser, do gene *APC*, foi encontrada em 1 controle, sugerindo que esse evento possa ser um polimorfismo comum, mesmo sendo descritas como raras nos bancos de dados disponíveis, como mostra a Tabela 5.

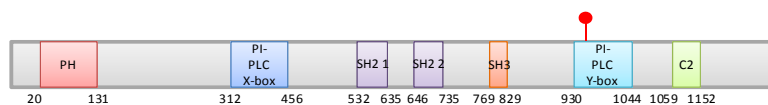
Tabela 5 - Investigação da presença das alterações em um grupo de 96 amostras de sangue de pessoas não afetadas (grupo controle).

Gene	Troca	Alteração	Paciente	Status alélico	Frequência na população*	Patogenicidade da alteração encontrada
APC	A>G	Met1413Val	-			
	G>A	Gly2502Ser	C80	Hetero	0,008 (19/2169)	Tolerada/benigna
	A>G	Ile2541Val	-			
PLCG2	A>G	Asn946Ser				

As alterações investigadas no grupo controle estão apresentadas indicando a alteração em nível de nucleotídeo e a respectiva alteração na proteína. Controle no qual alteração foi encontrada. *Status* alélico – identificação da alteração em homozigose ou heterozigose pelo sequenciamento capilar. Frequência na população – frequência da alteração observada na população descrita nos bancos de dados dbSNP e 1000 Genomes. Patogenicidade da alteração – predição de patogenicidade das alterações por análises *in silico* nos programas Sift e Polyphen.

Por ter sido encontrada em um controle, a alteração Gly2502Ser foi descartada. No total, obtivemos 3 alterações que foram encontradas apenas nos pacientes. Dessas 3 alterações, uma delas não está descrita nos bancos de dados (*APC*, Ile2541Val), uma não tem frequência associada (*PLCG2*, Asn946Ser), e uma delas (*APC* Met1413Val), apresenta uma frequência bastante baixa, sendo considerada uma alteração rara. As alterações encontradas em cada gene estão marcadas no esquema abaixo, onde é mostrado cada gene e seus vários domínios (Figura13).

PLCG2



APC

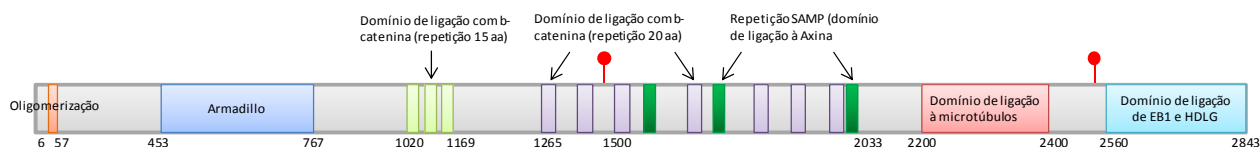


Figura 13 - Esquema representativo das proteínas dos genes *PLCG2* e *APC* a posição dos aminoácidos e os respectivos domínios. As alterações encontradas no estudo estão marcadas em vermelho. Os esquemas foram baseados nos dados fornecidos pelo UniProtKB.

Alterações pontuais no gene *CTNNB1* relacionadas a troca de uma base são encontradas em aproximadamente 10% dos casos de TW, e esse número aumenta quando também é observada mutação de *WT1*. Como no sequenciamento realizado na plataforma Ion Torrent, não encontramos alteração em *CTNNB1*, decidimos realizar o sequenciamento capilar direcionado apenas da região de 843 pb, que engloba o *hotspot* descrito no gene (éxon 3, códon 45) nos 54 tumores, como mostra a Figura 14. Não foi encontrada alteração em nenhum dos 54 tumores, mesmo nas 2 amostras com deleção de *WT1*, concordando com os resultados do sequenciamento na plataforma Ion Torrent, e reforçando a confiabilidade da plataforma na detecção de trocas de base.

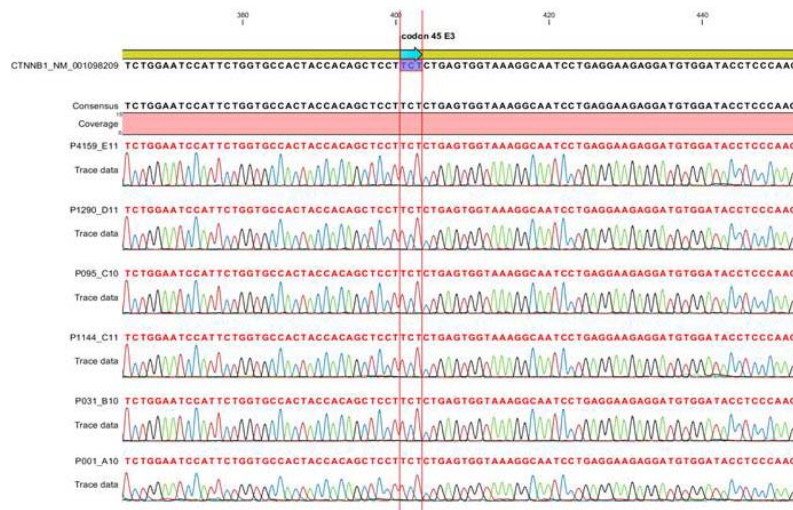


Figura 14 – Sequenciamento capilar do *hotspot* do gene *CTNNB1*. Rastreamento da região que apresenta o *hotspot* descrito do gene em 54 amostras de tumor de Wilms. A alteração não foi encontrada em nenhum caso.

4.8 ANÁLISE DO PADRÃO DE SUBSTITUIÇÕES SOMÁTICAS NAS REGIÕES INTRÔNICAS

As alterações de trocas de base identificadas nas porções intrônicas dos cinco genes investigados foram avaliadas com o objetivo de caracterizar o espectro de substituições presentes nos tumores de Wilms.

Para avaliar essas regiões, realizamos uma análise do perfil de trocas encontradas nas mesmas.

As substituições presentes nos tumores foram classificadas como SNPs (quando estavam presentes em pelo menos um dos indivíduos controles) e substituições somáticas (SS) - quando estavam ausentes nos controles. A Tabela 6 descreve o número e a classe das alterações encontradas em cada amostra.

Tabela 6 - Número e classificação das substituições de base intrônicas.

ID	Tipo	G:C>T:A	G:C>C:G	G:C>A:T	A:T>G:C	A:T>T:A	A:T>C:G	Total
C1	SNPs	170	219	875	939	180	190	2573
C3	SNPs	147	203	825	854	163	150	2342
C4	SNPs	173	228	796	836	156	148	2337
P001	SNPs	107	163	480	559	96	125	1530
	SS	49	62	249	160	55	44	619
P031	SNPs	67	103	352	501	62	100	1185
	SS	42	58	202	163	28	39	532
P095	SNPs	101	135	410	534	103	121	1404
	SS	66	100	314	217	65	73	835
P1060	SNPs	92	154	531	664	107	142	1690
	SS	22	45	183	149	29	60	488
P1068	SNPs	91	145	411	686	94	130	1557
	SS	43	72	226	244	41	53	679
P1110	SNPs	83	126	384	592	83	106	1374
	SS	45	82	247	220	65	50	709
P1144	SNPs	103	155	494	620	89	103	1596
	SS	34	67	240	143	45	34	569
P1290	SNPs	78	125	386	606	76	78	1390
	SS	66	68	297	266	52	66	826
P178	SNPs	83	130	469	548	78	83	1421
	SS	28	37	184	111	27	28	422
P246	SNPs	93	148	532	594	112	93	1596
	SS	53	66	262	207	51	53	711
P396	SNPs	61	112	339	494	75	61	1188
	SS	35	78	197	150	36	35	543
P4159	SNPs	88	130	413	569	96	88	1413
	SS	36	68	212	155	51	36	565
P4181	SNPs	61	102	297	433	56	61	1028
	SS	19	23	167	131	30	19	393
P4272	SNPs	46	80	265	332	61	46	862
	SS	38	98	197	95	46	38	536
P970	SNPs	98	156	508	714	132	98	1755
	SS	35	73	238	198	50	35	660

ID – amostra avaliada. Tipo – tipo de alteração encontrada. Classes das possíveis alterações. SNPs: *Single Nucleotide Polymorphisms*; SS: substituições somáticas.

O cálculo da frequência de cada classe de substituição demonstrou que o tipo de substituição germinativa mais frequente - tanto nos SNPs das amostras controles como nos SNPs dos tumores - foi a transição A:T>G:C, que apresentou frequência entre 35,8 e 44,1%, seguida pela transição G:C>A:T (26,4 a 35,2%) (Figura 15).

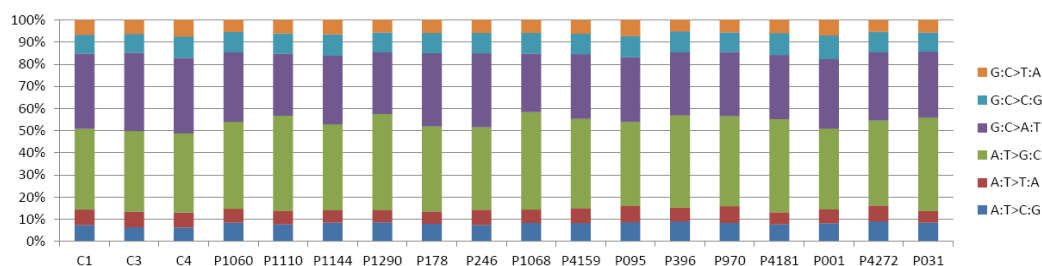


Figura 15 - Espectro de substituições de base germinativas (SNPs) presente nas 3 amostras controles (C1, C3 e C4) e nas 15 amostras tumorais.

Em relação às substituições somáticas presentes nas amostras tumorais, houve uma inversão entre as duas classes de alterações mais frequentes observadas nos controles.

Em todos os tumores (exceto P1068) a transição G:C>A:T foi a mais frequente (33,3 a 43,6%), seguida pela transição A:T>G:C (17,7 a 35,9%) (figuras 16A e 17). Além disso, quando comparados aos SNPs presentes nas amostras tumorais, as substituições somáticas apresentaram um aumento estatisticamente significativo de trocas G:C>T:A ($p=0,032$), G:C>A:T ($p<0,0001$) e A:T>T:A ($p<0,002$) e uma diminuição na frequência de trocas A:T>G:C ($p<0,0001$) (Figura 17).

Para investigar quais classes de alterações estavam aumentadas ou diminuídas em cada tumor, foram subtraídas as médias das frequências observadas nos controles para cada amostra (Figura 16B). A variação da frequência de cada classe se mostrou heterogênea entre os diversos tumores, sendo que a amostra que demonstrou um padrão mais alterado de substituições foi a P4272. Interessantemente este tumor foi o único em nossa casuística que apresentou na análise de CGH-array perda homozigota do gene *WTX*.

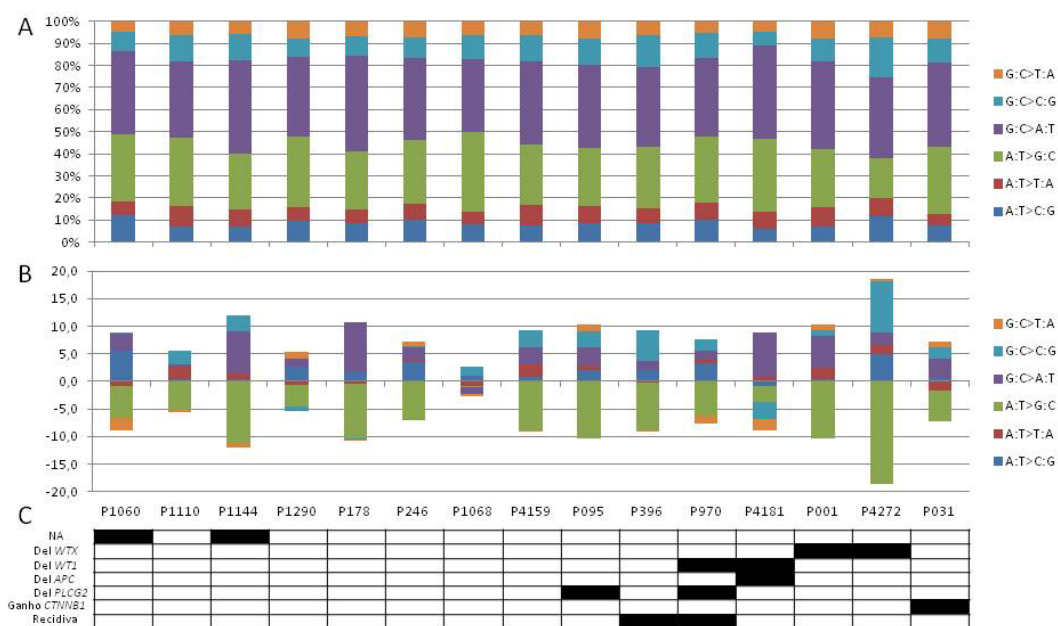


Figura 16 - Frequência e variação dos tipos de substituição somática. A: Padrão de substituições de base somáticas presente nas amostras tumorais. B: Variação da frequência de cada classe em relação à média dos controles. C: Características genéticas (ganhos e perdas nos cinco genes estudados, avaliados por CGH-array pela Dra. Ana Krepschi) e clínicas (informação sobre recidiva) dos tumores. NA: não avaliados por CGH-array; Del: deleção.

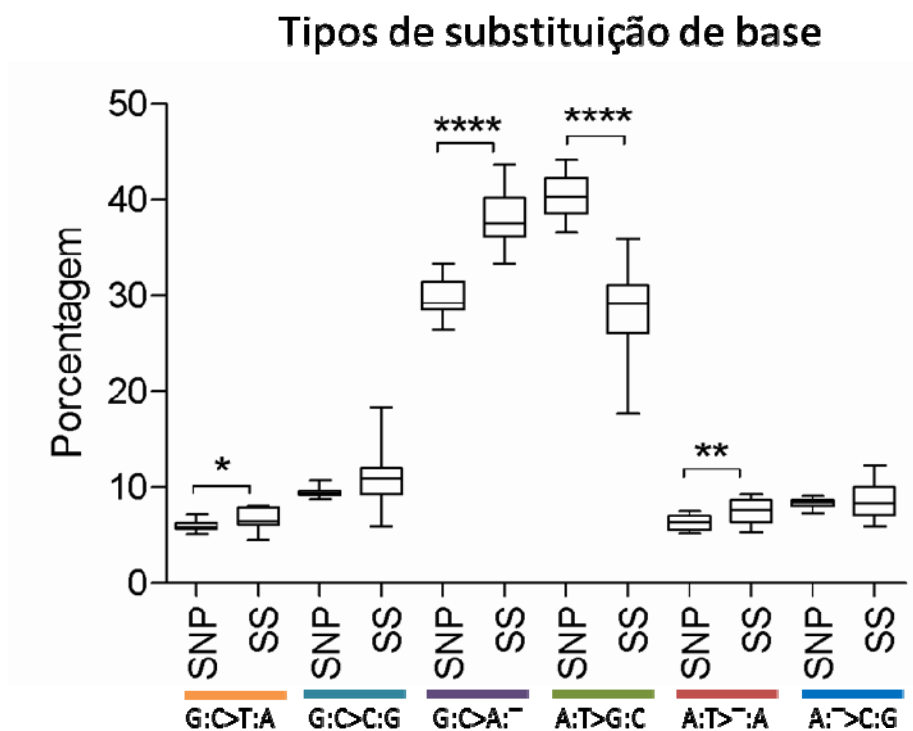


Figura 17 - Frequências das substituições de base em SNPs tumorais e substituições somáticas (SS). A comparação por teste *t* com dados pareados entre as médias das frequências das SS em relação aos SNPs tumorais demonstrou que as transições A:T>G:C ($p < 0,0001$) e G:C>A:T ($p < 0,0001$) foram as trocas com maior diferença entre os grupos. As trocas G:C>T:A ($p = 0,032$) e A:T>T:A ($p < 0,002$) apresentaram uma frequência elevada nas SS, enquanto a taxa de transição G:C>C:G ($p = 0,056$) e A:T>C:G ($p = 0,516$) não apresentaram diferenças estatisticamente significantes.

5 DISCUSSÃO

O tumor de Wilms é o tumor renal infantil mais comum, apresentando padrão de desenvolvimento semelhante os estágios iniciais da formação do rim normal. Diversos estudos tem buscado uma alteração desencadeadora do tumor, mas nenhum gene foi associado a um grande número de casos, sendo os genes *WTX*, *WT1* e *CTNNB1*, os responsáveis por aproximadamente 30% dos casos, deixando a maioria deles, sem um gene associado (RUTESHOUSER et al. 2008).

Um trabalho anterior realizado pelo grupo identificou os genes *APC* e *PLCG2*, ambos pertencentes à via de sinalização WNT, como possíveis candidatos para estarem alterados em TWs (MASCHIETTO et al. 2008), sendo o *PLCG2* associado pela primeira vez a uma doença.

Através das novas tecnologias de sequenciamento que permitem a avaliação de grandes regiões genômicas, foi de grande interesse avaliar o perfil de alteração desses novos genes (*APC* e *PLCG2*) possivelmente associados à tumorigênese dos TWs, assim como aqueles genes previamente associados (*WTX*, *WT1* e *CTNNB1*), com o intuito de caracterizar um perfil de alteração em TWs.

Optamos por realizar o sequenciamento da região completa dos 5 genes de interesse, obtendo dessa forma, um painel mais completo das possíveis alterações nos genes. Foi realizada a amplificação de fragmentos longos, de aproximadamente 10 Kb, para que uma região maior pudesse ser

coberta.

Nessa etapa, observamos que apenas a qualidade do DNA não é suficiente para a amplificação perfeita de fragmentos longos. Mesmo trabalhando com DNA tumoral de qualidade ótima, a amplificação dos fragmentos longos, foi uma etapa trabalhosa e demorada, até mesmo ao amplificar os controles. A dificuldade na amplificação foi observada tanto em regiões que continham éxons, quanto aquelas apenas com íntrons.

Ao analisar os dados gerados no sequenciamento realizado na plataforma Ion Torrent, foi observada uma excelente cobertura das bibliotecas, sendo notada uma maior cobertura dos genes de tamanho menor (*WTX*, *WT1* e *CTNNB1*) quando comparado com os outros dois genes avaliados (*APC* e *PLCG2*). Esse dado é importante, pois torna os dados gerados no sequenciamento bastante confiáveis.

Ao analisarmos os dados obtidos, identificamos um alto número de alterações que reportavam a deleção de uma base. Por ser uma plataforma nova, selecionamos apenas algumas alterações para validação (aproximadamente 20% das deleções encontradas) para tentar um melhor entendimento da confiabilidade dos dados gerados por essa plataforma. Apesar de não ter sido possível validar nenhuma das alterações que apresentavam deleção de uma base, mesmo obtendo uma cobertura média das alterações de aproximadamente 220x, acreditamos que exista uma porcentagem dessas alterações que sejam verdadeiras.

Um trabalho realizado por LOMAN (2012), comparou as plataformas 454 GS Junior (Roche), Ion Torrent (Life Technologies) e MiSeq (Illumina), e

mostrou que a plataforma Ion Torrent apresenta um alto índice de erro ao se tratar de alterações do tipo deleção ou inserção de uma base. Foi observado 1,5 *indels* a cada 100 bases na plataforma Ion Torrent, enquanto o 454 GS Junior, apresentou 0,38 *indels* a cada 100 bases, e o MiSeq valores menores que 0,001, sendo a maioria delas encontradas em regiões de homopolímeros, nas três plataformas avaliadas. No nosso caso, não observamos diferença significativa entre a presença de *indels* nas regiões de homopolímero, quando comparado à outras regiões do gene. Esse trabalho serve como suporte para os dados gerados no sequenciamento dos 15 tumores, uma vez que 92,5% das alterações encontradas eram casos de *indels*.

Observamos que muitas das deleções encontradas estavam presentes em mais de um tumor, sendo algumas delas reportadas em todos os 15 casos, o que nos leva a crer que essas alterações não são alterações reais, e sim erros do próprio sequenciador. Independentemente de ser um erro frequente da plataforma de sequenciamento escolhida, seria necessária uma validação de todas as 342 deleções encontradas nos 15 tumores e controles, a fim de verificar quais delas são deleções verdadeiras, e quais são erros de sequenciamento.

Por outro lado, observamos que essa plataforma é bastante confiável nos casos de identificação de troca de base. Foram encontradas 8 alterações que reportavam esse fenômeno, e 6 delas foram confirmadas através de sequenciamento capilar. Nas 2 alterações onde não foi possível essa confirmação, observamos que havia um baixo número de *reads*

cobrindo a base alterada (mínimo 4, máximo 10), com 2 ou 3 *reads* reportando a alteração. Em contrapartida, nos casos em que a troca de base foi confirmada, tivemos um número alto de sequências cobrindo a região que apresentava a alteração, variando entre 300 a 1800 sequências, com pelo menos 50% das *reads* reportando a troca. Apenas em um dos casos confirmados, tivemos uma cobertura da base alterada de apenas 17 *reads*, no entanto, a alteração estava presente em 15 delas. Isso nos mostra que os dados gerados quanto à troca de base na plataforma utilizada são significativamente confiáveis.

Apesar de mutações em *WTX*, *WT1* e *CTNNB1* estarem associadas à um grande número de casos de TWs, não foi encontrada alterações referente a substituição de base em nenhum desses genes no sequenciamento, apenas deleção ou inserção. Algumas dessas deleções ou inserções estavam entre as selecionadas para validação, porém, não foram confirmadas.

Para certificar-se da qualidade do sequenciamento em larga escala, realizamos o sequenciamento capilar de uma região de 843 pares de bases, referente à região em que se localiza o éxon 3 do gene *CTNNB1*, devido ao fato de diversos trabalhos (SPARKS 1998; MIYAKI 1999) descreverem esse sítio como sendo um *hotspot* do gene, com presença de alteração em 50% dos casos, quando na presença concomitante de *WT1* (LI 2004). Após sequenciamento de todos os 54 tumores, não encontramos essa alteração em nenhum dos casos.

Esse dado sugere que nossos dados de sequenciamento em grande

escala são confiáveis e que, ao contrário do que está descrito na literatura, mutação em *CTNNB1* é, um evento, aparentemente raro, pelo menos em nossa casuística.

Das 6 alterações confirmadas que reportavam a troca de uma base levando a mudança de aminoácido, 3 delas (*APC* - Met1413Val, Ile2541Val, *PLCG2* - Asn946Ser) foram identificadas apenas nos tumores. A alteração Met1413Val está descrita nos bancos de dados como sendo uma SNV rara, com frequência de 0,001 na população.

No gene *APC*, existe uma região com 10 domínios, localizados próximos um do outro, de ligação com a β -catenina. Alguns desses domínios de ligação são encontrados na região de cluster de mutação (MCR) do gene (BEROUD 1996), geralmente sendo casos de deleção ou inserção, que leva à formação de uma proteína truncada (GALIATSATOS 2006). A maior parte das mutações no *APC* são encontradas no último éxon, principalmente devido ao seu tamanho, que corresponde à aproximadamente 77% da proteína.

A alteração Met1413Val está descrita nos bancos de dados como sendo uma SNV rara, com frequência de 0,001 na população. Essa alteração é encontrada entre 2 dos 10 domínios de ligação com a β -catenina, podendo ter algum impacto na ligação das duas proteínas.

A segunda alteração encontrada no gene *APC*, Ile2541Val, não está descrita em nenhum banco de dados. Essa troca se localiza fora de domínios, mas próximo ao domínio de ligação do *APC* com EB1.

Indo de acordo com achados de diferentes estudos e bancos de dados, ambas as mutações estão localizadas no último éxon do *APC*.

Achamos interessante essa última alteração não estar descrita em nenhum banco de dados, uma vez que o gene *APC* é um gene que está associado a diversos tipos de tumores, é exaustivamente estudado e rastreado em diferentes tumores, tendo um volume de informações na literatura bastante grande. Acreditamos que para verificar o real impacto dessas alterações, seria importante realizar ensaios funcionais posteriores.

A terceira alteração encontrada, a Asn946Ser, presente no gene *PLCG2*, está descrita no banco de dados, porém como foi descrita apenas uma vez, e pelo fato de gene ser pouco rastreado, não há frequência populacional associada à essa alteração.

A troca está localizada dentro do domínio Pi-PLC-Y-bax, que está envolvido em atividades catalíticas, podendo ter algum papel na função da proteína. Pelo fato do *PLCG2* ser um gene que não é muito estudado, poucas alterações estão descritas nos bancos de dados disponíveis. Após analisar a alteração nos programas de predição, verificamos que ela também foi classificada como sendo tolerada ou benigna.

Os programas de predição de patogenicidade de proteína baseado em estrutura são amplamente utilizados para classificação da patogenicidade de alterações, no entanto, seus dados não são definitivos na classificação de uma alteração, uma vez que esses programas se baseiam na predição de como seria a estrutura proteica após a alteração. Um exemplo disso é a alteração Arg2525His encontrada no *APC* em nosso

estudo, e confirmada, porém descartada para busca no grupo independente de amostra, por estar em um dos controles no sequenciamento massivo. A alteração foi classificada com provavelmente danosa, porém está presente em um indivíduo considerado normal. Mesmo as 3 alterações tendo sido classificadas pelos bancos de predição SIFT e PolyPhen como tolerada ou benigna, o fato de não estar presente nos controles, associada à baixa frequência na população, ou a não descrição, sugerem que essas alterações possam ser patogênicas, sendo necessários estudos adicionais para que seja possível entender melhor o papel dessas alterações.

Todos os cânceres acumulam mutações somáticas em seu genoma e os padrões de mutação presentes nas células tumorais refletem os processos de dano e reparo ao DNA aos quais estas células e seus precursores foram expostos durante o processo de formação do tumor (PLEASANCE et al. 2010).

Historicamente, análises dos padrões de mutações somáticas eram predominantemente restritas aos genes considerados causadores do câncer, como *TP53*. Estes estudos iniciais demonstraram que padrões de mutação podem estar relacionados a exposições a carcinógenos específicos e revelaram, por exemplo, que transversões G:C>T:A predominam no câncer de pulmão associado ao fumo, devido ao dano no DNA induzido por carcinógenos do tabaco, tal como benzo[a]pireno (PFEIFER et al. 2002). Da mesma forma, transições C>T e CC>TT ocorrem em uma elevada taxa nos cânceres de pele, como o melanoma, refletindo a formação de dímeros de

pirimidina que ocorre após a exposição do DNA à luz UV (PFEIFER et al. 2005).

Estes trabalhos, apesar de altamente informativos, apresentam algumas limitações, visto que suas análises foram baseadas em mutações causadoras e os efeitos da seleção acabam se sobrepondo aos padrões mutacionais gerados pelos processos de dano e reparo ao DNA. Entretanto, a maioria das mutações somáticas que ocorrem nos tumores, como as intrônicas, são consideradas alterações “de passagem”, e não contribuem para o desenvolvimento do câncer. Desta maneira, estes milhares de alterações não sofrem o efeito da seleção e por isso sua análise permite uma maior resolução do espectro mutacional e melhor compreensão dos processos mutacionais causadores do tumor (PLEASANCE et al. 2010; NIK-ZAINAL et al. 2012).

Comparado com câncer de pulmão e melanoma, processos mutacionais responsáveis por outros tipos de câncer ainda são pouco compreendidos. Neste sentido, neste trabalho avaliamos as mutações somáticas intrônicas presentes nos cinco genes sequenciados para caracterizar o espectro de substituições de base presentes nos tumores de Wilms. Foi observado que os tipos de substituições somáticas mais frequentes foram as transições G:C>A:T (33,3 a 43,6%) e A:T>G:C (17,7 a 35,9%), e que as SS tumorais apresentavam uma maior frequência das trocas G:C>T:A, G:C>A:T e A:T>T:A em relação aos SNPs tumorais. Em relação à substituição G:C>A:T, esta também foi a troca encontrada em maior frequência em amostras de cânceres de mama e colorretal, sendo que

nos tumores colorretais foi observado um aumento de trocas em dinucleotídeos 5'-CpG-3' e em mama em 5'-TpC-3', evidenciando mecanismos mutacionais distintos nestes dois tipos de tumor (SJOBLOM et al. 2006).

Com esta análise também foi possível observar que a variação da frequência de cada classe se mostrou heterogênea entre as diversas amostras de tumores de Wilms. A presença de um padrão distinto de mutações somáticas pode indicar que uma via específica de dano e/ou reparo de DNA esteja alterada nesta amostra.

6 CONCLUSÕES

Com o presente trabalho, podemos concluir que:

- 1) A metodologia escolhida para o trabalho foi satisfatória, tendo cumprido a proposta inicial, que foi a de cobrir a região dos 5 genes de interesse através de reações de PCRs longas, diminuindo assim, o número de fragmentos que cobriam cada gene, e sendo essa etapa realizada através da construção de bibliotecas de fragmentos.
- 2) A plataforma Ion Torrent, lançada recentemente no mercado, é confiável na detecção de alterações que reportam a troca de uma base nucleotídica, porém, seus dados quanto aos achados de casos de *indels*, não são confiáveis.
- 3) Não foram encontradas alterações pontuais nas regiões codificadoras dos genes *WT1*, *WTX* e *CTNNB1* nos quinze TWs analisados neste estudo.
- 4) Foram encontradas 2 alterações no gene *APC* (descrever as alterações) que levam a alteração de aminoácido e que não foram detectadas em indivíduos controles, podendo se tratar de alterações patogênicas.
- 5) Foi encontrada uma alteração (*Asn946Ser*) em *PLCG2* que leva a alteração de aminoácido e que não foi detectada em indivíduos controles, podendo se tratar de alteração patogênica.

- 6) Nas alterações somáticas da grande maioria dos TWs foi observado uma maior frequência da transição G:C>A:T, o que difere da maior frequência observada nos SNPs (A:T>G:C) de amostras controles e TWs.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R. beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. **EMBO J** 1997; 16:3797-804.

Aoki K, Taketo MM. Adenomatous polyposis coli (APC): a multi-functional tumor suppressor gene. **J Cell Sci** 2007; 120:3327-35.

Beckwith JB. Wilms' tumor and other renal tumors of childhood: a selective review from the National Wilms' Tumor Study Pathology Center. **Hum Pathol** 1983; 14:481-92.

Beckwith JB. Precursor lesions of Wilms tumor: clinical and biological implications. **Med Pediatr Oncol** 1993; 21:158-68.

Beniers AJ, Efferth T, Fuzesi L, Granzen B, Mertens R, Jakse G. p53 expression in Wilms' tumor: a possible role as prognostic factor. **Int J Oncol** 2001; 18:133-9.

Beroud C, Soussi T. APC gene: database of germline and somatic mutations in human tumors and cell lines. **Nucleic Acids Res** 1996; 24:121-4.

Bienz M, Hamada F. Adenomatous polyposis coli proteins and cell adhesion. **Curr Opin Cell Biol** 2004; 16:528-35.

Bilic J, Huang YL, Davidson G, et al. Wnt induces LRP6 signalosomes and promotes dishevelled-dependent LRP6 phosphorylation. **Science** 2007; 316:1619-22.

Birch JM, Alston RD, McNally RJ, et al. Relative frequency and morphology of cancers in carriers of germline TP53 mutations. **Oncogene** 2001; 20:4621-8.

Birchmeier W, Hulsken J, Behrens J. Adherens junction proteins in tumour progression. **Cancer Surv** 1995; 24:129-40.

Breslow N, Beckwith JB, Ciol M, Sharples K. Age distribution of Wilms' tumor: report from the National Wilms' Tumor Study. **Cancer Res** 1988; 48:1653-7.

Buckley KS. Pediatric genitourinary tumors. **Curr Opin Oncol** 2011; 23:297-302.

Ceschel S, Cassoto V, Valsecchi GM, et al. Survival after relapse in children with solid tumors: a follow up study from Italian off-therapy registry. **Pediatr Blood Cancer** 2006; 47:560-6.

Cheah PL, Looi LM, Chan LL. Immunohistochemical expression of p53 proteins in Wilms' tumour: a possible association with the histological prognostic parameter of anaplasia. **Histopathology** 1996; 28:49-54.

Corbin M, de Reyniès A, Rickman DS, et al. WNT/beta-catenin pathway activation in Wilms tumors: a unifying mechanism with multiple entries? **Genes Chromosomes Cancer** 2009; 48:816-27.

Davies JA, Lodomery M, Hohenstein P, et al. Development of an siRNA-based method for repressing specific genes in renal organ culture and its use to show that the WT1 tumour suppressor is required for nephron differentiation. **Hum Mol Genet** 2004; 13:235-46.

De Camargo B, de Oliveira Santos M, Rebelo MS, et al. Cancer incidence among children and adolescents in Brazil: first report of 14 population-based cancer registries. **Int J Cancer** 2010; 126:715-20.

Dehner LP. The evolution of the diagnosis and understanding of primitive and embryonic neoplasms in children: living through an epoch. **Mod Pathol** 1998; 11:669-85.

Dome JS, Coppes MJ. Recent advances in Wilms tumor genetics. **Curr Opin Pediatr** 2002; 14:5-11.

Galiatsatos P, Foulkes WD. Familial adenomatous polyposis. **Am J Gastroenterol** 2006; 101:385-98.

Grohmann A, Tanneberger K, Alzner A, Schneikert J, Behrens J. AMER1 regulates the distribution of the tumor suppressor APC between microtubules and the plasma membrane. **J Cell Sci** 2007; 120:3738-47.

Guertl B, Leuschner I, Guelly C, Ebner B, Kronberger C, Hoefler G. Is predisposition for nephroblastoma linked to polymorphisms of the WTX gene? **Pathol Oncol Res** 2010; 16:189-91.

Hanson CA, Miller JR. Non-traditional roles for the Adenomatous Polyposis Coli (APC) tumor suppressor protein. **Gene** 2005; 361:1-12.

Haruta M, Arai Y, Sugawara W, et al. Duplication of paternal IGF2 or loss of maternal IGF2 imprinting occurs in half of Wilms tumors with various structural WT1 abnormalities. **Genes Chromosomes Cancer** 2008; 47:712-27.

Hastie ND. The genetics of Wilms tumor: a case of disrupted development. **Annu Rev Genet** 1994; 28:523-58.

Hastie ND. Life, sex, and WT1 isoforms--three amino acids can make all the difference. **Cell** 2001; 106:391-4.

He TC, Sparks AB, Rago C, et al. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. **Science** 1998; 281:1509-12.

Henderson BR, Fagotto F. The ins and outs of APC and β -catenin nuclear transport. **EMBO Rep** 2002; 3:834-9.

Huff V. Wilms' tumours: about tumour suppressor genes, an oncogene and a chameleon gene. **Nat Rev Cancer** 2011; 11:111-21. Review.

Hurley JH, Grobler JA. Protein kinase C and phospholipase C: bilayer interactions and regulation. **Curr Opin Struct Biol** 1997; 7:557-65.

Jenkins ZA, van Kogelenberg M, Morgan T, et al. Germline mutations in WTX cause a sclerosing skeletal dysplasia but do not predispose to tumorigenesis. **Nat Genet** 2009; 41:95-100.

Kaneda A, Wang CJ, Cheong R, et al. Enhanced sensitivity to IGF-II signaling links loss of imprinting of IGF2 to increased cell proliferation and tumor risk. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2007; 104:20926-31.

Kaneko Y, Homma C, Maseki N, Sakurai M, Hata J. Correlation of chromosome abnormalities with histological and clinical features in Wilms' and other childhood renal tumors. **Cancer Res** 1991; 51:5937-42.

Kimelman D, Xu W. beta-catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective. **Oncogene** 2006; 25:7482-91.

Klaus A, Birchmeier W. Wnt signalling and its impact on development and cancer. **Nat Rev Cancer** 2008; 8:387-98.

Koesters R, Ridder R, Kopp-Schneider A, et al. Mutational activation of the betacatenin proto-oncogene is a common event in the development of Wilms' tumors. **Cancer Res** 1999; 59:3880-2.

Koesters R, Niggli F, von Knebel Doeberitz M, Stallmach T. Nuclear accumulation of beta-catenin protein in Wilms' tumours dagger. **J Pathol** 2003, 199:68-76.

Korinek V, Barker N, Morin PJ, et al. Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma. **Science** 1997; 275:1784-7.

Kreidberg JA, Sariola H, Loring JM, et al. WT-1 is required for early kidney development. **Cell** 1993; 74:679-91.

Kusafuka T, Miao J, Kuroda S, Udatsu Y, Yoneda A. Codon 45 of the β -catenin gene, a specific mutational target site of Wilms' tumor. **Int J Mol Med** 2002; 10:395-9.

Larsson SH, Charlieu JP, Miyagawa K, et al. Subnuclear localization of WT1 in splicing or transcription factor domains is regulated by alternative splicing. **Cell** 1995; 81:391-401.

Li CM, Guo M, Borczuk A, et al. Gene expression in Wilms tumor mimics the earliest committed stage in the metanephric mesenchymal-epithelial transition. **Am J Pathol** 2002; 160:2181-90.

Li W, Kessler P, Williams BR. Transcript profiling of Wilms tumors reveals connections to kidney morphogenesis and expression patterns associated with anaplasia. **Oncogene** 2005; 24:457-68.

Little J. **Epidemiology of childhood cancer**. Lyon: International Agency for Research on Cancer, World Health Organization; 1999. Introduction; p.1-9. (IARC Scientific Publications n° 149).

Loman NJ, Misra RV, Dallman TJ, et al. Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms. **Nat Biotechnol** 2012; 30:434-9.

Maiti R, Alam R, Amos CI, Huff V. Frequent Association of b-Catenin and WT1 Mutations in Wilms Tumors. **Cancer Res** 2000; 60:6288-92.

Major MB, Camp ND, Berndt JD, et al. Wilms tumor suppressor WTX negatively regulates WNT/beta-catenin signaling. **Science** 2007; 316:1043-6.

Mannens M, Slater RM, Heyting C, et al. Molecular nature of genetic changes resulting in loss of heterozygosity of chromosome 11 in Wilms' tumours. **Hum Genet** 1988; 81:41-8.

Maschietto M, De Camargo B, Brentani H, et al. Molecular profiling of isolated histological components of Wilms tumor implicates a common role for Wnt signaling pathways in the kidney development and in the tumor. **Oncology** 2008; 75:81-91.

Maschietto M, Trapé AP, Piccoli FS, et al. Temporal blastemal cell gene expression analysis in the kidney reveals new Wnt and related signaling pathway genes to be essential for Wilms' tumor onset. **Cell Death Dis** 2011; 2:e224.

Maw MA, Grundy PE, Millow LJ, et al. A third Wilms' tumor locus on chromosome 16q. **Cancer Res** 1992; 52:3094-8.

McCartney BM, Näthke IS. Cell regulation by the Apc protein Apc as master regulator of epithelia. **Curr Opin Cell Biol** 2008; 20:186-93.

Messahel B, Williams R, Ridolfi A, et al. Allele loss at 16q defines poorer prognosis Wilms tumour irrespective of treatment approach in the UKW1-3 clinical trials: a Children's Cancer and Leukaemia Group (CCLG) Study. **Eur J Cancer** 2009; 45:819-26.

Miyaki M, Iijima T, Kimura J, et al. Frequent mutation of beta-catenin and APC genes in primary colorectal tumors from patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. **Cancer Res** 1999; 59:4506-9.

Moore AW, McInnes L, Kreidberg J, Hastie ND, Schedl A. YAC complementation shows a requirement for WT1 in the development of epicardium, adrenal gland and throughout nephrogenesis. **Development** 1999; 126:1845-57.

Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, et al. Activation of b-catenin–Tcf signaling in colon cancer by mutations in b-catenin or APC. **Science** 1997; 275:1787-90.

Moser AR, Dove WF, Roth KA, Gordon JI. The Min (multiple intestinal neoplasia) mutation: its effect on gut epithelial cell differentiation and interaction with a modifier system. **J Cell Biol** 1992; 116:1517-26.

Mrowka C, Schedl A. Wilms' tumor suppressor gene WT1: from structure to renal pathophysiologic features. **J Am Soc Nephrol** 2000; 11(Suppl 16):S106-15.

Munemitsu S, Albert I, Souza B, Rubinfeld B, Polakis P. Regulation of intracellular b-catenin levels by the adenomatous polyposis coli (APC) tumor-suppressor protein. **Proc Natl Acad Sci USA** 1995; 92:3046-50.

Neufeld KL, Zhang F, Cullen BR, White RL. APC-mediated downregulation of beta-catenin activity involves nuclear sequestration and nuclear export. **EMBO Rep** 2000; 1:519-23.

Niksic M, Slight J, Sanford JR, Caceres JF, Hastie ND. The Wilms' tumour protein (WT1) shuttles between nucleus and cytoplasm and is present in functional polysomes. **Hum Mol Genet** 2004; 13:463-71.

Nik-Zainal S, Alexandrov LB, Wedge DC, Van Loo P, et al. Mutational processes molding the genomes of 21 breast cancers. **Cell** 2012; 149:979-93.

Nusse R. Cancer: converging on β -Catenin in Wilms Tumor. **Science** 2007; 316:988-9.

Pfeifer GP, Denissenko MF, Olivier M, Tretyakova N, Hecht SS, Hainaut P. Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers. **Oncogene** 2002; 21:7435-51.

Pfeifer GP, You YH, Besaratinia A. Mutations induced by ultraviolet light. **Mut Res** 2005; 571:19-31.

Pleasance ED, Cheetham KR, Stephens PJ, et al. A comprehensive catalogue of somatic mutations from a human cancer genome. **Nature** 2010; 463, 191-6.

Polakis P. Wnt signaling and cancer. **Genes Dev** 2000; 14:1837-51.

Polakis P. The many ways of Wnt in cancer. **Curr Opin Genet Dev** 2007; 17:45-51.

Rivera MN, Haber DA. Wilms' tumour: connecting tumorigenesis and organ development in the kidney. **Nat Rev Cancer** 2005; 5:699-712.

Rivera MN, Kim WJ, Wells J, et al. An X chromosome gene, WTX, is commonly inactivated in Wilms tumor. **Science** 2007; 315:642-5.

Rivera MN, Kim WJ, Wells J, et al. The tumor suppressor WTX shuttles to the nucleus and modulates WT1 activity. **Proc Natl Acad Sci USA** 2009; 106:8338-43.

Roberts SG. Transcriptional regulation by WT1 in development. **Curr Opin Genet Dev** 2005; 15:542-7.

Rong Y, Cheng L, Ning H, et al. Wilms' tumor 1 and signal transducers and activators of transcription 3 synergistically promote cell proliferation: a possible mechanism in sporadic Wilms' tumor. **Cancer Res** 2006; 66:8049-57.

Rosin-Arbesfeld R, Townsley F, Bienz M. The APC tumour suppressor has a nuclear export function. **Nature** 2000; 406:1009-12.

Rosin-Arbesfeld R, Cliffe A, Brabletz T, Bienz M. Nuclear export of the APC tumour suppressor controls beta-catenin function in transcription. **EMBO J** 2003; 22:1101-13.

Rubinfeld B, Albert I, Porfiri E, Fiol C, Munemitsu S, Polakis P. Binding of GSK3beta to the APC-beta-catenin complex and regulation of complex assembly. **Science** 1996; 272:1023-6.

Rubinfeld B, Robbins P, El-Gamil M, Albert I, Porfiri E, Polakis P. Stabilization of beta-catenin by genetic defects in melanoma cell lines. **Science** 1997; 275:1790-2.

Ruteshouser EC, Robinson SM, Huff V. Wilms tumor genetics: mutations in WT1, WTX, and CTNNB1 account for only about one-third of tumors. **Genes Chromosomes Cancer** 2008; 47:461-70.

Schedl A. Renal abnormalities and their developmental origin. **Nat Rev Genet** 2007; 8:791-802.

Schumacher V, Schneider S, Figge A, et al. Correlation of germ-line mutations and two-hit inactivation of the WT1 gene with Wilms tumors of stromal-predominant histology. **Proc Natl Acad Sci USA** 1997; 94:3972-7.

Schwarz-Romond T, Fiedler M, Shibata N, et al. The DIX domain of Dishevelled confers Wnt signaling by dynamic polymerization. **Nat Struct Mol Biol** 2007; 14:484-92.

Scott RH, Douglas J, Baskcomb L, et al. Constitutional 11p15 abnormalities, including heritable imprinting center mutations, cause nonsyndromic Wilms tumor. **Nat Genet** 2008; 40:1329-34.

Skotnicka-Klonowicz G, Rieske P, Bartkowiak J, Szymik-Kantorowicz S, Daszkiewicz P, Debiec-Rychter M. 16q heterozygosity loss in Wilms' tumour in children and its clinical importance. **Eur J Surg Oncol** 2000; 26:61-6.

Sjoblom T, Jones S, Wood LD, et al. The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. **Science** 2006; 314:268-74.

Slater RM, Mannens MM. Cytogenetics and molecular genetics of Wilms' tumor of childhood. **Cancer Genet Cytogenet** 1992; 61:111-21.

Sparks AB, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. Mutational analysis of the APC/beta-catenin/Tcf pathway in colorectal cancer. **Cancer Res** 1998; 58:1130-4.

Sredni ST, Gadd S, Huang CC, et al. Subsets of very low risk Wilms tumor show distinctive gene expression, histologic, and clinical features. **Clin Cancer Res** 2009; 15:6800-9.

Steenman M, Redeker B, de Meulemeester M, et al. Comparative genomic hybridization analysis of Wilms tumors. **Cytogenet Cell Genet** 1997; 77:296-303.

Sugiyama H. WT1 (Wilms' tumor gene 1): biology and cancer immunotherapy. **Jpn J Clin Oncol** 2010; 40:377-87.

Tanneberger K, Pfister AS, Kriz V, Bryja V, Schambony A, Behrens J. Structural and functional characterization of the Wnt inhibitor APC membrane recruitment 1 (Amer1). **J Biol Chem** 2011; 286:19204-14.

Tetsu O, McCormick F. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. **Nature** 1999; 398:422-6.

Tsuchiya T, Tamura G, Sato K, et al. Distinct methylation patterns of two APC gene promoters in normal and cancerous gastric epithelia. **Oncogene** 2000; 19:3642-6.

Vainio S, Lin Y. Coordinating early kidney development: lessons from gene targeting. **Nat Rev Genet** 2002; 3:533-43.

Vajjhala PR, Macmillan E, Gonda T, Little M. The Wilms' tumour suppressor protein, WT1, undergoes CRM1-independent nucleocytoplasmic shuttling. **FEBS Lett** 2003; 554:143-8.

Wegert J, Wittmann S, Leuschner I, Geissinger E, Graf N, Gessler M. WTX inactivation is a frequent, but late event in Wilms tumors without apparent clinical impact. **Genes Chromosomes Cancer** 2009; 48:1102-11.

Wodarz A, Nusse R. Mechanisms of Wnt signaling in development. **Annu Rev Cell Dev Biol** 1998; 14:59-88.

Yashima K, Maitra A, Timmons CF, et al. Expression of the RNA component of telomerase in Wilms tumor and nephrogenic rest recapitulates renal embryogenesis. **Hum Pathol** 1998; 29:536-42.

Yu P, Constien R, Dear N, et al. Autoimmunity and inflammation due to a gain-of-function mutation in phospholipase C gamma 2 that specifically increases external Ca²⁺ entry. **Immunity** 2005; 22:451-65.

Zhang F, White RL, Neufeld KL. Phosphorylation near nuclear localization signal regulates nuclear import of adenomatous polyposis coli protein. **Proc Natl Acad Sci USA** 2000; 97:12577-82.

Zhuang Z, Merino MJ, Vortmeyer AO, et al. Identical genetic changes in different histologic components of Wilms' tumors. **J Natl Cancer Inst** 1997; 89:1148-52.

Anexo 1 - Tabela com quantificações e volume de cada um dos 60 fragmentos em um dos pacientes, exemplificando os cálculos para chegar à molaridade e volume desejados de cada fragmento antes de dar início à confecção dos pools individuais de cada paciente. Esses cálculos foram feitos para todos os pacientes.

Paciente 1060								
Fragmento	Tamanho pb	[] ng/ul	Volume	Massa total (ng)	Molaridade (pmol)	mol/vol	Volume para 0,002 pmoles	
WTX 1	8026	0,60	6,3	3,7674	0,000722153	0,000114627	6,10673913	0,0007
WTX 2	7967	1,68	8,3	13,944	0,002692646	0,000324415	2,157729167	
WTX 3.1 A	928	0,44	10,5	4,662	0,00772878	0,000736074	0,950990991	
WTX 3.2 C	1537	26,10	24	626,4	0,626995646	0,026124819	0,026794444	
WTX 3.2 B	1018	17,40	28	487,2	0,736285326	0,026295904	0,026620115	
WTX 3.3	1468	10,50	11	115,5	0,121043806	0,011003982	0,063613333	
WTX 3.4	1057	77,80	11	855,8	1,245615312	0,113237756	0,006181684	
WT1 1	9671	13,21	48,5	640,685	0,101920094	0,002101445	0,333104088	
WT1 2 a	4950	21,30	3	63,9	0,01986014	0,006620047	0,105739437	
WT1 2 b	5230	1,33	5,8	7,714	0,002269157	0,000391234	1,789210526	
WT1 3 a	5343	8,42	8,7	73,254	0,021092731	0,002424452	0,288725059	
WT1 4	8269	0,92	26	23,816	0,004431007	0,000170423	4,107418122	
WT1 5 a	4298	47,30	3,5	165,55	0,059258331	0,016930952	0,041344397	
WT1 5 b	4883	6,81	5	34,05	0,010727957	0,002145591	0,326250367	
CTNNB1 1	3346	8,85	7,3	64,605	0,029704814	0,004069153	0,172025989	
CTNNB1 2	8271	0,84	18,5	15,5955	0,002900868	0,000156804	4,464181495	
CTNNB1 3	8295	6,59	40	263,6	0,048889507	0,001222238	0,57272003	
CTNNB1 4	8509	0,77	64,5	49,8585	0,009014618	0,000139762	5,008531695	
CTNNB1 5	8336	0,48	19,5	9,3405	0,001723848	8,84025E-05	7,918329854	
APC 1.1	443	40,20	10	402	1,396075708	0,139607571	0,005014055	
APC 4	9310	2,91	8	23,28	0,00384698	0,000480873	1,455687285	
APC 1 G	11795	2,23	17,8	39,694	0,005177422	0,000290866	2,406603139	
APC 7c	2677	2,87	9	25,83	0,014844401	0,001649378	0,424402439	
APC 3 G	8863	0,485	9	4,365	0,000757688	8,41875E-05	8,314773196	
APC 4 G	5612	0,963	7	6,741	0,001847963	0,000263995	2,651568017	
APC 5 G	12100	2,6	26	67,6	0,008595041	0,000330579	2,1175	
APC 6 G	9150	26,22	48	1258,56	0,211611602	0,004408575	0,158781465	
APC 11b	4867	3,05	58	176,9	0,055918193	0,000964107	0,726060656	
2APC 11a	5157	1,69	4	6,76	0,002016676	0,000504169	1,388423077	
APC 8 G	6708	21,2	16	339,2	0,077794597	0,004862162	0,143968868	
APC 13.2	5655	0,267	10,5	2,8035	0,000762701	7,26382E-05	9,636797753	
APC 12 G	10269	7,276	22	160,072	0,023981363	0,001090062	0,642165338	
APC 15 A1	1708	7,47	9	67,23	0,060556656	0,006728517	0,104034806	
APC 15 B1	1014	63,40	11	697,4	1,058109543	0,096191777	0,007277129	
APC 15.2	2260	120,00	7,5	900	0,612661675	0,081688223	0,008569167	
APC 15.3	2228	25,30	16	404,8	0,279519403	0,017469963	0,040068775	
APC 15 E1	1269	21,1	28	590,8	0,71625144	0,025580409	0,027364692	
APC 15.4 B	1561	20,1	31,5	633,15	0,624008279	0,019809787	0,03533607	
PLCG2 1.3	421	0,489	9	4,401	0,016082587	0,001786954	0,391728016	
PLCG2 3	8006	0,24	20	4,76	0,000914699	4,57349E-05	15,30558824	
PLCG2 3.2	5656	24,60	3,5	86,1	0,02341965	0,006691328	0,104613008	
PLCG2 4	7874	0,93	24	22,344	0,004365683	0,000181903	3,848195489	
PLCG2 5	8052	0,23	26,5	6,201	0,001184799	4,47094E-05	15,65666667	
PLCG2 6	7925	0,40	23	9,2	0,001785974	7,76511E-05	9,0146875	
PLCG2 7a	3467	0,40	9	3,591	0,001593486	0,000177054	3,953596491	
PLCG2 7b	4500	1,46	13	18,98	0,006488889	0,000499145	1,40239726	
PLCG2 8	429	19,30	17	328,1	1,176618254	0,069212838	0,010113731	
PLCG2 9	8269	4,293	22	94,446	0,017571839	0,00079872	0,876402283	
PLCG2 10	8007	3,13	9	28,17	0,005412572	0,000601397	1,163956869	
PLCG2 11	7998	5,4	28,5	153,9	0,029603555	0,001038721	0,673905556	
PLCG2 12 a	4339	0,37	9	3,321	0,001177513	0,000130835	5,350257453	
PLCG2 12 b	3857	3,65	9	32,85	0,013103049	0,001455894	0,48080411	
PLCG2 13.2	6720	11,7	15,5	181,35	0,041517857	0,002678571	0,261333333	
PLCG2 14	7986	5,69	11,5	65,435	0,012605714	0,001096149	0,638599297	
PLCG2 15	7789	1,46	19	27,74	0,005479127	0,000288375	2,427393836	
PLCG2 15.1	6613	29,77	19,5	580,515	0,13505217	0,006925752	0,101072052	
PLCG2 15.2	1176	68,00	27	1836	2,40188383	0,08895866	0,007868824	

Anexo 2 - Tabela com todas as alterações encontradas no sequenciamento na plataforma Ion Torrent, juntamente com a porcentagem da alteração encontrada, separadas por gene. Algumas das alterações são encontradas em mais de um paciente.

Gene	Alteração	% das reads com presença da alteração	Pacientes que reportaram a alteração
WTX	Ser1068fs	Deleção 35,3%/40,90%	P396/C1
	Arg51fs	Deleção 62,9%/42,10%/38,80%	P246/P178/P396
	Gly552fs	Deleção 40,6%/42,30%/39,30%/40,90%	P1290/P178/P396/C4
	Val968fs	Deleção 61,8%/64%/40%/43,40%/36,50%/36,40%	P1110/P4159/P1290/P178/P396/C3
	Ala133fs	Deleção 35,90%	P396
	Ala211fs	Deleção 40,00%	P1290
	Ala275fs	Deleção 35,10%	P1060
	Ala449fs	Deleção 39,30%	P178
	Ala464fs	Deleção 36,40%	P1060
	Ala585fs	Deleção 50,9%/60,90%/37,90%/41,90%/38,10%/45,80%	P970/P1110/P1144/P1290/P1060/C3
	Ala973fs	Deleção 40,00%	P1060
	Gln913fs	Deleção 38,3%/36,50%/43,30%/50%	P178/P396/P1060/C4
	Gly236fs	Deleção 38,50%	P396
	Gly432fs	Deleção 40,00%	P1060
	His1094fs	Deleção 62,5%/42,40%	P4181/C1
	Leu487fs	Deleção 36,7%/39,10%	P1290/C3
	Lys12fs	Deleção 46,40%	P1060
	Lys64fs	Deleção 35,00%	C4
	Pro1029fs	Deleção 35,00%	P1290
	Pro804fs	Deleção 41,70%	P1060
	Pro805fs	Deleção 60%/36,40%	P1068/P1290
	Ser1068fs	Deleção 35,3%/40,90%	P396/C1
	Ser318fs	Deleção 35,70%	P178
	Ser514fs	Deleção 45,9%/38%/36,80%/47,20%	P1290/P178/P396/P1060

Thr95fs	Deleção	63,3%/50%/38,90%/42,90%	P246/P1068/P1144/C3
Val155fs	Deleção	42,90%	P1290
Gly1031fs	Deleção	53,6%/54,20%/59,30%/54,90%/39,30%/35,60%/42,90%/ 37,20%/40,80%/41,90%/37,90%/36,80%	P095/P970/P1068/P1110/P1144/P031/P1290/P178/P396/P1060/C1/C3
Pro1038fs	Deleção	56,4%/4,60%/60,20%/39%/37,50%/37,70%/39,20%/36,80%/38,10%	P095/P970/P4181/P1290/178/P396/P1060/C1/ C3
Pro1058fs	Deleção	56,9%/61,30%/52%/56,80%/59%/40,10%/50%/41,30%/44,70%/44,70%/43,40%/35,60%/48,70%/41,10%/43,20%	P095/P246/P970/P1068/P1110/P1144/P4159/P031/P1290/P178/P396/P1060/C1/C3/C4

Gene	Alteração	% das reads com presença da alteração	Pacientes que reportaram a alteração
WT1	Ala313fs	Deleção	52,6%/54,10%/53,70%/52%/49,10%/36,70%/46,30%/66,70%/46,90%/36,40%/46,50%/38,90%/44,80%/38,50%/44,40%
	Ala375fs	Deleção	35,00%
	Arg389fs	Deleção	36%/45,90%
	Gly338fs	Deleção	38,10%
	Leu515fs	Deleção	49%/38,10%/36%/38,3%/41,80%/35,50%/38,6%
	Ser381fs	Deleção	38,1%/43,80%
	Val318fs	Deleção	36,4%/37,10%

Gene	Alteração	% das reads com presença da alteração	Pacientes que reportaram a alteração
CTNNB1	Ala239fs	Deleção	43,6%/44,20%/36%
	Ala518fs	Deleção	50,00%
	Ala576fs	Deleção	42,10%
	Gln92Arg	A>G	60,00%
	Glu105fs	Deleção	50%/36,40%
	Glu226fs	Deleção	36,4%/40,60%/38,80%/37,50%
	Glu562fs	Deleção	38,5%/47,10%
	Gly616fs	Deleção	37,8%/37,50%/46,20%/45%/47,10%
	Gly725fs	Deleção	35,90%/40,0%
	Gly765fs	Deleção	38,10%/37,70%/40,90%
	Lys312fs	Deleção	50,00%

Met763Val	T>A	50,00%	P001
Ser502fs	Deleção	60%/52,30%/54,40%/51%/37,30%/41,40%	P001/P970/P1068/P1110/P1144/P4159
Ser718fs	Inserção	50,00%	P001
Val561fs	Deleção	40%/47,10%	C1/C4

Gene	Alteração	% das reads com presença da alteração	Pacientes que reportaram a alteração	
APC	Ala597fs	Inserção	42,90%	P396
	Ans641fs	Inserção	60,00%	P1068
	Arg1623fs	Deleção	35,30%	P1290
	Arg2525His	G>A	44,90%	C4
	Arg2833fs	Deleção	44%/43,90%/38,30%/43%/44,60%	P031/P1290/P178/C1/C4
	Gly2294fs	Deleção	41,20%/35,70%/37,50%	P1290/P178/C3
	Gly2502Ser	G>A	54,4%/45,90%	P1110/P1144
	Gly2827fs	Deleção	46,7%/40,30%/40%/35,30%	P396/P1060/C3/C4
	His33fs	Inserção	40%	P1144
	Ile2541Val	A>G	47,70%	P178
	Lys586fs	Deleção	40,00%	P396
	Met1413Val	A>G	53,70%	P970
	Met314fs	Deleção	61,1%/57,10%/56,20%/55,70%/40,80%/36,20%/46,20%/40%/44,30%/43,80%/36,70%/44%/48,40%/42,70%/47,70%	P095/P246/P970/P1068/P1144/P4159/P4181/P031/P1290/P178/P396/P1060/C1/C3/C4
	Met701fs	Deleção	46%/45,50%/40,80%/35%/35,90%/36,50%	P031/P1290/P178/P1060/C1/C3
	Phe178fs	Deleção	40,00%	P1290
	Pro2216fs	Deleção	36,50%	C1
	Pro2474fs	Deleção	58,1%/40%/42,50%/38,50%/43,10%/41%/38,90%/36,20%/42,70%/48,50%/43%	P970/P4159/P4272/P031/P1290/P178/P396/P1060/C1/C3/C4
	Ser1419fs	Deleção	62,2%/60,60%/54,60%/58,10%/57,90%/42%/39,80%/39,90%/40%/37,60%/64,10%/40,10%/40,30%/47,20%/41,50%/48,70%/48,30%	P095/P246/P970/P1068/P1110/P1144/P4159/P4181/P4272/P031/P1290/P178/P396/P1060/C1/C3/C4
	Thr2308fs	Deleção	42,5%, 40%, 39,30%, 37,20%	P031, P1290, P178, C3
	Thr584fs	Deleção	62,5%/52,40%/58,30%/36,80%/38,10%/35,70%/38%	P095/P246/P1068/P031/P1290/C3/C4
	Thr626fs	Deleção	50,00%	P396

Val1822Asp	T>A	98%/56,20%/98,30%/97,80%/98,10%/98,30%/98,40%/97,50%/96,60%/98,40%/98,80%/99,40%/49,70%/98,70%/98,40%/38,30%	P095/P970/P1068/P1110/P1144/P4159/P4181/P4272/P031/P1290/P178/P396/P1060/C1/C3/C4
Val312fs	Deleção	60,00%	P031
Val530fs	Deleção	61,1%/38,10%/40%/36,90%/35%/40%/36%	P246/P4181/P4272/P031/P1290/P396/C3

Gene

PLCG2

Alteração	% das reads com presença da alteração	Pacientes que reportaram a alteração
Ala21fs	Deleção 50,00%	P396
Arg582fs	Deleção 36,40%	P178
Arg687fs	Deleção 35,70%	C1
Asn946Ser	A>G 44,40%	P4181
Asp633fs	Deleção 50%/61,20%/45%/56,20%/35,50%	P095/P970/P031/C3/C4
Asp998fs	Deleção 64,9%, 44,60%, 41%, 40,60%, 48,50%	P246, P031, P396, P1060, C1
Cys791fs	Deleção 40%/42,90%	P1144/C1
Gly363fs	Deleção 37,00%	P031
Gly667fs	Deleção 50,00%	P1290
Gly804fs	Deleção 50%/71,40%/58,10%/40%	P246/P970/P1068/P1144
Gly866fs	Deleção 37%, 35,90%, 36%	P1144, P4272, C3
Hist244Arg	A>G 88,2%/43,90%/66,70%	P970/P1110/C4
Ile749fs	Deleção 37,5%/75%/54,10%/37,10%/46,20%/41,30%/37,50%/45%	P1144/P001/P1068/P031/P1290/P396/P1060/C3
Lys207fs	Deleção 40,00%	P4272
Lys801fs	Deleção 40,00%	C1
Pro171fs	Deleção 35,5%, 37,10%, 40,90%, 41,10%, 43,50%, 44,90%, 45,50%	P031, P1290, P178, P396, C1, C3, C4
Thr596fs	Deleção 37,5%/42,30%/37,90%/36,70%/45,70%	P178/P396/P1060/C1/C4
Trp258fs	Deleção 48,4%/36,70%/37,20%	P178/P4181/P4272
Trp646fs	Deleção 64,2%/50%	P1068/P178
Val1135fs	Deleção 40,00%	P178

Anexo 3 – Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)



**Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP**

São Paulo, 13 de Dezembro de 2010.

À
Dra. Dirce Maria Carraro

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1142/08
“Definição do perfil de alterações das sequências dos genes APC, B-catenina, WT1, WTX e PLCG2 em tumores de Wilms”.

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 07/12/2010, **tomaram conhecimento e aprovaram** o projeto emendado (datado de novembro/2010) contemplando modificações para mudança de nível de mestrado para doutorado.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Luiz Paulo Kowalski
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

1/1

São Paulo, 18 de Dezembro de 2008.

À
Dra. Dirce Maria Carraro

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1142/08
**"Definição do perfil de alterações das sequencias dos genes APC, B-catenina, WT1,
WTX e PLCG2 em tumores de Wilms".**

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação Antonio Prudente - Hospital A.C. Camargo, em sua última reunião de 09/12/2008, após analisarem as respostas aos questionamentos realizados em reunião de 11/11/2008, **aprovaram** a realização do estudo em referência, datado de Novembro/2008 e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

- Folha de Rosto para Pesquisa envolvendo Seres Humanos;
- Termo de Compromisso do Pesquisador com resoluções CNS;
- Termo de Dispensa do Consentimento Livre e Esclarecido;
- Orçamento financeiro detalhado;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Laboratório de Genômica e Biologia Molecular.

Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas à assistente do CEP dentro de 12 meses.

Atenciosamente,


Dr. Gilles Landman
1º Vice- Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER CONSUBSTANCIADO

Projeto: 1142/08

Título: "Definição do perfil de alterações das seqüências dos genes APC, β -catenina, WT1, WTX e PLCG2 em tumores de Wilms".

Pesquisador Responsável: Dra. Dirce Maria Carraro

Tese de Mestrado da Aluna: Bruna Durães de Figueiredo Barros

Patrocinador: FAPESP

Objetivo geral:

Definir alterações na seqüência genômica, incluindo exons e introns, correspondentes aos genes APC, β -catenina, WT1, WTX e PLCG2 em amostras de tumores de Wilms.

Pendências apontadas em parecer anterior:

- Questionamentos:

O projeto cita: o nosso grupo. Qual é esse grupo especificar. (pág. 2 da introdução).

Cita que a maioria dos casos de TW de Wilms é esporádica. Explicitar o que é esporádico: o que na doença, o surgimento da doença, da mutação...

Justificativa - O APC se torna interessante - explicitar.

- Correções solicitadas:

Corrigir erros de ortografia.

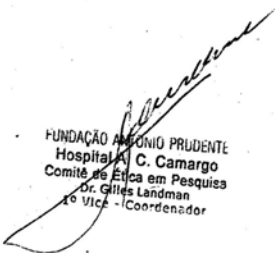
No item 3.1- amostras. Retirar a última frase que diz: Este projeto deverá ser enviado ao Comitê de Ética nos próximos dias.

Comentários finais:

Verificamos as respostas do pesquisador aos itens acima, assim como a documentação apresentada e consideramos respondidas todas as solicitações realizadas por este comitê.

Parecer Final:

Projeto Aprovado.


FUNDAÇÃO ANTONIO PRUDENTE
Hospital C. Camargo
Comitê de Ética em Pesquisa
Dr. Gilles Landman
1º VICE - Coordenador