

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS TUMORES DESMÓIDES

DANIELLE DE ALMEIDA BRAGGIO

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

Área de concentração: Oncologia

**Orientadora: Dra Isabela Werneck da Cunha
Co-Orientadora: Dra. Dirce Maria Carraro**

São Paulo

2015

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Braggio, Danielle de Almeida

Caracterização molecular dos tumores desmóides / Danielle de Almeida Braggio - São Paulo, 2015.

113p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientadora: Isabela Werneck da Cunha

Descritores: 1. FIBROMATOSE AGRESSIVA/genética. 2. CÉLULAS MESENQUIMAIS ESTROMAIS. 3. EXOMA/genética. 4. CARCINOGENESE. 5. MUTAÇÃO/genética.

O meu avô disse-me uma vez que havia dois tipos de pessoas: as que fazem o trabalho e as que ficam com os louvores. Ele disse-me para tentar ficar no primeiro grupo; há menos concorrência.”

Indira Gandhi

DEDICATÓRIA

A realização desse trabalho só foi possível porque existem pessoas especiais em minha vida, que através de seu amor, carinho e apoio incondicional vibraram e sofreram comigo durante todo o processo. A vocês, pai, mãe, Flavinha e Gui dedico esta tese.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Dra. Isabela Werneck da Cunha, por ter aberto as portas do A.C. Camargo para mim e por sua orientação, críticas e sugestões. Obrigada pela paciência, pela ajuda em tudo, por aceitar que eu fizesse mais da metade do meu doutorado fora do país. Eu imagino que não deva ter sido fácil me orientar desse jeito, mas o crescimento profissional e pessoal que resultaram disso são imensuráveis.

À minha co-orientadora, Dra. Dirce Maria Carraro, por ter permitido o desenvolvimento desse trabalho no Laboratório de Genômica e Biologia Molecular, por sua orientação e principalmente pela sua dedicação, paciência e confiança. Muito obrigada por ter sido essa co-orientadora sempre presente, prestativa e sempre pronta a ajudar.

À Dra. Elisa Napolitano Ferreira, simplesmente por tudo! Em cada jornada da nossa vida existem pessoas para as quais uma página é muito pouco para agradecer por tudo que elas fizeram por nós. Nesta jornada chamada doutorado, você, com certeza, foi uma dessas pessoas. Muito obrigada!

À Dra. Bruna Durães de Figueiredo Barros, por toda a ajuda com o sequenciamento de nova geração.

Aos meus orientadores estrangeiros, Dra. Dina Lev e Dr. Raphael E. Pollock, por terem aberto as portas para mim tão carinhosamente do laboratório de Sarcoma Research/Surgical Oncology, primeiro na University of Texas M.D. Anderson Cancer Center e depois na The Ohio State University, por toda a análise crítica deste trabalho e, principalmente, por terem me ajudado a crescer profissionalmente.

A todas as pessoas que ainda são ou que já foram do Laboratório de Genômica e Biologia Molecular e que de alguma forma foram importantes para o desenvolvimento deste trabalho: Mabelita, Márcia, Roberto, Giovana, Felipe, Tatiana, Carol, Cris, Alex, Rafael, Vanina, Daiana e Adriana.

A todos os meus amigos do A.C. Camargo, que me proporcionaram momentos de muitas risadas, mas que também dividiram comigo meus momentos de angústia: Maria, Gabi, Andrew, Bia, Frederico.

Aos bioinformatas Dr. Pedro Galante e Renan Valieris, por toda a ajuda na análise dos dados de sequenciamento.

Às meninas do Banco de Tumores, Eloísa, Vera, Bianca, Ana Paula, Louise.

Aos meus pais, Cirus e Esdra, e à minha irmã, Flavinha. Sem eles tudo o que eu conquistei até hoje seria impossível. Muito obrigada por todo o amor, cuidado, atenção, carinho que vocês me dedicaram. Obrigada por serem sempre meu porto-seguro!

Ao meu namorado, Guilherme, por todo amor, respeito, confiança, carinho, paciência e amizade. Eu sei que não é fácil aguentar essa distância, mas mesmo assim você sempre me motiva a ir em busca dos meus sonhos, sejam eles quais forem.

A todos os meus amigos, seja de escola, faculdade, mestrado, por, de uma maneira ou de outra, se fizerem presentes na minha vida. Vocês são fundamentais!

Aos responsáveis pela Pós-Graduação, em especial Ana Maria Kurinari, Luciane Pitombeira e Vanuza Barros. Muito obrigada por estarem sempre dispostas a ajudar.

A Biblioteca, Suely, pelo apoio na formatação da tese.

À CAPES pelo suporte financeiro.

RESUMO

Braggio DA. **Caracterização molecular dos tumores desmóides**. São Paulo; 2015. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente]

Os tumores desmóides são proliferações mesenquimais fibroblásticas que, apesar de não originarem metástase, são extremamente invasivos localmente. Esses tumores podem ser esporádicos ou relacionados a síndromes genéticas, como a polipose adenomatosa familiar (FAP). Algumas alterações moleculares já foram relatadas, entretanto, a tumorigênese desses tumores ainda não é totalmente compreendida. Assim, o objetivo desse estudo é analisar e comparar o espectro de mutações somáticas nos tumores desmóides esporádicos e associados a síndromes. Dez tumores desmóides foram analisados por sequenciamento do exoma. O DNA extraído foi utilizado para a construção de uma biblioteca. O DNA fragmentado foi hibridizado com moléculas de RNA correspondentes à região do exoma (50Mb) e posteriormente capturado. As bibliotecas foram amplificadas através de PCR em emulsão e sequenciadas utilizando o *SOLiD™ 4 System*. Os dados de sequenciamento foram analisados através de programas específicos, e as variantes identificadas somente no tecido tumoral foram selecionadas. A validação de algumas variantes foi realizada por sequenciamento alvo (*target sequencing*), por ser um método mais sensível através do Ion AmpliSeq e sequenciamento na plataforma Ion PGM. Nossos resultados confirmaram as mutações somáticas nos genes *ABCC2*, *SLCO1C1*, *TTC37*, *ANKRD17*, *CADPS*, *DCAF4L1*, *PNN*, *LARGE*, *ARHGAP32*, *ITGB1*, *SI* e *TPP2*. Interessantemente, nossos resultados obtidos através do sequenciamento do exoma mostraram que a mutação no códon 45 (S45F) do gene *CTNNB1* foi encontrada mesmo nos casos onde a análise por Sanger não detectou nenhuma mutação neste gene, corroborando a hipótese de que os tumores desmóides são dependentes da via WNT/ β -catenina. Além disso, esse resultado tem um significado clínico

importante, uma vez que a mutação S45F do gene *CTNNB1* foi associada a uma pior taxa de sobrevida livre de doença. Na era da terapia-alvo, o conhecimento de alterações genéticas que possam ajudar na estratificação de pacientes que precisem receber um acompanhamento mais frequente, ou mesmo um tratamento mais agressivo, tornou-se crucial, uma vez que pode auxiliar no controle dessa doença.

SUMMARY

Braggio DA. **[Molecular characterization of desmoid tumors]**. São Paulo; 2015. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente]

Desmoid tumors (DTs) are unique mesenchymal fibroblastic proliferations that, despite the absolute lack of ability to metastasize, are extremely locally invasive. The great majority of DTs occur sporadically, most of these are caused by somatic mutations in β -catenin (*CTNNB1*) that lead to a constitutive activation of WNT pathway. A small number of DTs can occur in the background of familial adenomatous polyposis (FAP) and are associated with inactivating germline mutations in the adenomatous polyposis coli (*APC*) gene. However, as the genetic profile of desmoid tumors has not been studied extensively and remains poorly characterized, the aim of this project was to analyze the spectrum of somatic mutations in desmoid tumors. Ten DTs were analyzed by massive parallel sequencing (exome). DNA was captured by hybridization in solution to cRNA oligonucleotide baits, subjected to an emulsion PCR, and then sequenced using the *SOLiD™ 4 System*. The sequence data were analyzed through specific bioinformatics software and the variants identified only in tumor were selected for further validation. For the sake of higher sensitivity and specificity, target sequencing using customized Ion AmpliSeq™ panels on the Ion PGM™ platform were used to validate the alterations observed using the *SOLiD™ 4*. We identified somatic mutations in *ABCC2*, *SLCO1C1*, *TTC37*, *ANKRD17*, *CADPS*, *DCAF4L1*, *PNN*, *LARGE*, *ARHGAP32*, *ITGB1*, *SI* and *TPP2* genes. Interestingly, our whole exome sequencing results showed that the mutation at codon 45 (S45F) of *CTNNB1* gene was found even in those cases where the Sanger sequencing did not detect any mutation. These results corroborate the hypothesis that desmoid tumors are dependent on the Wnt/ β -catenin pathway. Furthermore, this observation is clinically meaningful since the S45F *CTNNB1* mutation has been associated with higher rates of local

recurrence in desmoid tumors. In the era of molecular targeted therapeutics, the knowledge of genetic alterations that may help to stratify patients for closer follow up or more aggressive treatment is crucial and could possibly assist in the control of this disease.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Diferentes tipos de tumores desmóides.....	4
Figura 2	Localização dos tumores desmóides.....	5
Figura 3	Imuno-histoquímica para β -catenina.....	7
Figura 4	Via canônica de sinalização de Wnt/ β -catenina.....	17
Figura 5	Regiões do gene APC.....	19
Figura 6	Regiões da β -catenina.....	22
Figura 7	Sistema de enriquecimento de região alvo.....	38
Figura 8	Sequenciamento SOLiD™.....	40
Figura 9	<i>Color-code</i>	41
Figura 10	Preparo de biblioteca para Ion AmpliSeq™.....	46
Figura 11	Gel de agarose.....	48
Figura 12	Gel de agarose 2% da reação de PCR.....	49
Figura 13	Análise fragmentação do DNA (pool de bibliotecas 2).....	53
Figura 14	Análise das bibliotecas de DNA amplificadas (pool de bibliotecas 2).....	54
Figura 15	Análise de 10 bibliotecas pós-captura (pool de bibliotecas 1)	55

Figura 16	Resultado da WFA do pool de bibliotecas 1 e 2.....	56
Figura 17	Deposição das sondas na lâmina de sequenciamento.....	57
Figura 18	Sequenciamento do exoma.....	65
Figura 19	Validação do sequenciamento do exoma (<i>ADAR</i> e <i>HSPD1</i>)...	66
Figura 20	Validação do sequenciamento do exoma (<i>CADPS</i> e <i>MTCH2</i>)..	67
Figura 21	Validação do sequenciamento do exoma (<i>CTNNB1</i>).....	69
Figura 22	Alinhamento das leituras obtidas pelo sequenciamento na plataforma Ion Torrent contra a sequência genômica.....	76
Figura 23	Distribuição dos genes potencialmente associados aos tumores desmóides esporádicos.....	77
Figura 24	Distribuição dos genes potencialmente associados aos tumores desmóides associados à FAP.....	77

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1	Dados mutacionais do gene <i>APC</i> nos tumores desmóides incluídos nesse estudo.....	51
Tabela 2	Dados mutacionais do gene <i>CTNNB1</i> nos tumores desmóides incluídos nesse estudo.....	51
Tabela 3	Dados gerados pelo sequenciamento do exoma dos tumores desmóides utilizando a plataforma SOLiD.....	59
Tabela 4	Variações somáticas presentes nas amostras dos tumores desmóides (não presentes nos leucócitos das respectivas amostras) e ausentes no dbSNP.....	61
Tabela 5	Variações escolhidas para validação inicial.....	62
Tabela 6	Variações escolhidas para validação inicial por sequenciamento capilar.....	64
Tabela 7	Resultados da cobertura do sequenciamento (<i>target seq</i>) do painel de genes.....	71
Tabela 8	Alterações analisadas nos tumores desmóides através do Ion Ampliseq™.....	72
Tabela 9	Mutações somáticas validadas nos tumores desmóides através do Ion Ampliseq™.....	75
Tabela 10	Concordância entre os resultados do sequenciamento automático por Sanger e do sequenciamento de nova geração.....	79

Tabela 11	Detalhes da concordância entre os resultados do sequenciamento automático por Sanger e do sequenciamento de nova geração.....	79
Quadro 1	Critérios para diagnóstico clínico da polipose adenomatosa familiar (FAP)	32
Quadro 2	Primers desenhados para validação do sequenciamento do exoma	43

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

° C	Graus Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
APC	do inglês, <i>Adenomatous polyposis coli</i>
cDNA	do inglês, DNA complementar ao RNA
Ca²⁺	Cálcio
CDS	do inglês, <i>coding DNA sequence</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CK1	Caseína quinase 1
CNV	do inglês, <i>copy number variation</i>
CTAD	do inglês, <i>C-terminal activation domain</i>
DNA	do inglês, <i>Deoxyribonucleic acid</i>
EDTA	do inglês, <i>Ethylene Diamine TetrAcetic Acid</i>
NCI	do inglês, <i>national cancer institute</i>
FAP	do inglês, <i>Familial Adenomatous Polyposis</i>
GSK-3β	Glicogênio Sintase Quinase-3β
H&E	coloração Hematoxilina-Eosina
HNPCC	do inglês, <i>Hereditary Non Polyposis Colorectal Carcinoma</i>
INDELS	Alteração de inserção ou deleção de base
Kb	do inglês, <i>kilobase</i>
kDa	do inglês, <i>kilodalton</i>
LEF	do inglês, <i>Lymphoid Enhancing Factor</i>
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensageiro
NCBI	do inglês, <i>National Center for Biotechnology Information</i>
NCI	do inglês, <i>National Cancer Institute</i>
ng	Nanograma

NGS	do ingles, <i>next generation sequencing</i>
NSY	do inglês, <i>non-synonymous mutation</i>
NTAD	do inglês, <i>N-terminal activation domain</i>
LDL	do inglês, <i>Low-density lipoprotein</i>
LPR	do inglês, <i>LDL-receptor-related protein</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
pb	pares de base
PCR	do inglês, <i>polymerase chain reaction</i>
Polyphen	do inglês, <i>Polymorphism Phenotyping</i>
RPM	Rotações Por Minuto
SNP	do inglês, <i>single nucleotide polymorphism</i>
Sps	do inglês, <i>splicing site</i>
STP	do inglês, <i>stop codon mutation</i>
TCF	do inglês, <i>T-cell factor</i>
TDs	Tumores desmóides
WFA	do inglês, <i>workflow analysis</i>

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Os Tumores Desmóides	2
1.2	Diagnóstico	5
1.3	Etiologia	7
1.4	Fatores de Risco	9
1.5	Tratamento	11
1.6	Desregulação da via de Wnt/ β -Catenina nos Tumores Desmóides	13
1.7	Mutações na via Wnt nos Tumores Desmóides	16
1.7.1	<i>APC</i>	17
1.7.2	<i>CTNNB1</i>	21
1.8	O Potencial Terapêutico da via de Sinalização Wnt	26
1.9	Sequenciamento de nova geração como Estratégia para identificação de novas Mutações	27
1.10	Justificativa	28
2	OBJETIVOS	30
2.1	Objetivos Gerais	30
2.2	Objetivos Específicos	30
3	MATERIAL E MÉTODO	31
3.1	Comitê de Ética em Pesquisa	31
3.2	Pacientes	31
3.3	Desenho do Estudo	32
3.4	Extração do DNA	33
3.5	Sequenciamento dos Genes <i>APC</i> e <i>CTNNB1</i> pelo método de Sanger	33
3.5.1	Reação em cadeia da Polimerase (PCR)	34
3.5.2	Purificação dos produtos de PCR e reação de Sequenciamento	35
3.6	Sequenciamento do Exoma	36
3.7	Análise do Sequenciamento do Exoma	39

3.8	Validação por Sequenciamento automático direto (método Sanger).....	43
3.9	Validação por Target sequencing usando Ion AmpliSeq™ e a Plataforma Ion PGM	44
3.10	Descrição das Mutações encontradas.....	46
3.11	Significância Patogênica das Mutações encontradas.....	47
4	RESULTADOS	48
4.1	Extração do DNA.....	48
4.2	Sequenciamento dos Genes <i>APC</i> e <i>CTNNB1</i> pelo método de Sanger.	49
4.3	Confecção das Bibliotecas	52
4.4	Análise do Sequenciamento do Exoma	58
4.5	Validação por Sanger	63
4.6	Validação por Sequenciamento NGS e painel de Genes (target seq) utilizando Ion AmpliSeq™ e Plataforma Ion PGM	70
4.7	Sequenciamento Automático x Sequenciamento de nova Geração na Detecção da Mutação do Gene <i>CTNNB1</i>	78
5	DISCUSSÃO	80
6	CONCLUSÕES	95
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97

ANEXOS

Anexo 1 Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP

Anexo 2 Quadro com os *primers* desenhados para o sequenciamento dos genes *APC* e *CTNNB1*.

Anexo 3 Tabela com todas as alterações encontradas no sequenciamento do exoma através do SOLiD após a aplicação de filtros robustos (207 SNVs e 35 INDELS).

1 INTRODUÇÃO

Sarcomas são tumores malignos de origem mesenquimal. Os dois principais tipos de sarcomas são os sarcomas ósseos e os sarcomas de partes moles. Os sarcomas de partes moles podem acometer músculos, gordura, tendões, nervos periféricos, tecidos fibrosos, vasos sanguíneos ou tecidos mais profundos da pele. Eles podem ser encontrados em qualquer parte do corpo, mas a maioria se desenvolve nas extremidades (SINGER et al. 2000). Os sarcomas de parte moles correspondem a 1% de todas as neoplasias malignas em adultos (RAJPUT e KRAYBILL 2003).

Dados de incidência mundial mostram que os sarcomas de partes moles acometem de 1.8 a 5 pessoas a cada 100.000 habitantes (WIBMER et al. 2010). Para 2015, o Instituto Nacional de Câncer dos Estados Unidos (NCI, do inglês *National Cancer Institute*) estima 11.930 novos casos de sarcomas de partes moles e 4.870 mortes causadas por esse tipo de tumor. No Brasil, estima-se que ocorram 3.400 novos casos por ano e essa incidência tem aumentado, como resultado do melhor conhecimento sobre esse tipo de câncer, o que leva a um melhor diagnóstico.

Os tumores de partes moles podem ser benignos ou malignos, levando-se em conta seu potencial metastático. Dentre os tumores considerados benignos, encontra-se a fibromatose. A fibromatose é uma doença com origem no tecido fibroso e que pode ser dividida em fibromatose superficial e fibromatose profunda. A forma superficial de fibromatose

geralmente se desenvolve de forma menos agressiva e inclui a doença de Dupuytren, fibromatose plantar e doença de Peyronie (DE BREE et al. 2004). A fibromatose profunda apresenta um perfil mais agressivo e é conhecida como fibromatose agressiva, fibromatose tipo-desmóide ou, principalmente, como tumor desmóide.

1.1 OS TUMORES DESMÓIDES

Os tumores desmóides (TDs) são raros, compreendendo 0,03% de todas as neoplasias e 3% de todos os tumores de partes moles. A incidência estimada na população mundial é de dois a quatro casos por cada milhão de pessoas (REITAMO et al. 1986).

A origem celular dos tumores desmóides ainda é desconhecida, porém acredita-se que esses tumores são originados a partir de células chamadas fibroblastos. Os fibroblastos são encontrados em todo o nosso corpo e sua principal função é fornecer suporte estrutural e proteção para os órgãos vitais, tais como: pulmão, fígado, vasos sanguíneos, coração, rins, pele, intestinos, etc. Além de suporte e proteção de órgãos vitais, os fibroblastos também desempenham um papel crítico na cicatrização de feridas.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), os tumores desmóides são definidos como uma proliferação clonal de fibroblastos que surge nos tecidos moles profundos e são caracterizados pelo crescimento infiltrativo e uma tendência de recorrência local, mas uma incapacidade de

produzir metástase. Apesar de serem considerados histologicamente benignos e de não serem capazes de gerar metástase, os tumores desmóides apresentam um comportamento localmente agressivo, associado a uma alta taxa de recorrência local após ressecção (DE BREE et al. 2009). A caracterização dos tumores desmóides como um processo neoplásico, e não uma hiperplasia fibrosa inflamatória, foi reforçada pelos estudos moleculares de inativação do cromossomo X, onde foi observado padrões uniformes de inativação do cromossomo X em todos os tumores desmóides incluídos nesse estudo, enquanto o tecido normal se mostrou heterozigoto. Estes resultados confirmaram que os tumores desmóides são um verdadeiro processo neoplásico e não um processo reativo policlonal (LI et al. 1996; DE WEVER et al. 2000).

Apesar de serem um processo clonal, a biologia e o comportamento dos tumores desmóides podem variar bastante. Em termos de crescimento celular, os tumores desmóides podem variar de pequenas massas com crescimento lento até tumores agressivos. Assim como o crescimento celular, o curso clínico da doença também é imprevisível, variando desde crescimento tumoral incessante até estabilização ou mesmo regressão tumoral sem qualquer intervenção médica (KASPER et al. 2011).

Esses tumores podem ocorrer em qualquer parte do corpo e são classificados através de sua localização anatômica em: tumores desmóides extra-abdominal, abdominal ou intra-abdominal (**Figura 1**).

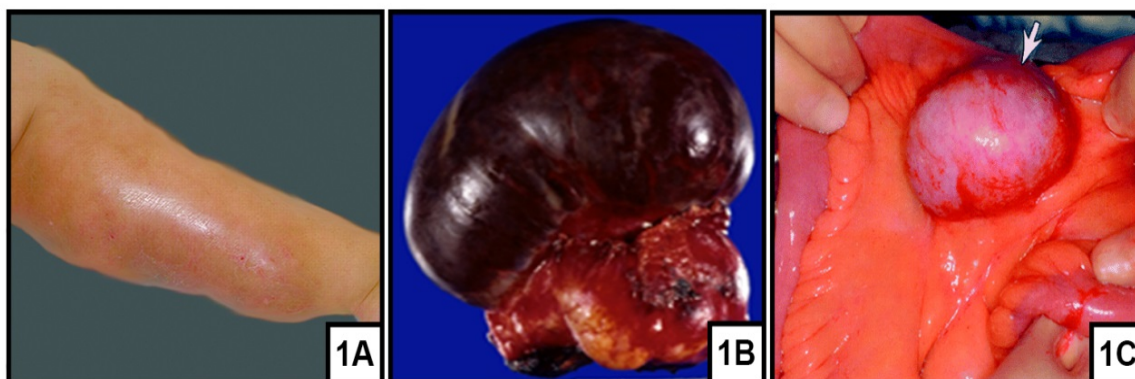


Imagem retirada de *PathologyOutlines.com* (1A,1C) e gentilmente cedida pelo Dr. Raphael Pollock (1B)

Figura 1 - Diferentes tipos de tumores desmóides. Os desmóides podem ser classificados como extra-abdominal (1A; tumor localizado na panturrilha), abdominal (1B, tumor localizado na parede abdominal) ou intra-abdominal (1C; tumor localizado no mesentério do intestino delgado).

Os tumores desmóides extra-abdominais, em geral, ocorrem na proximidade articular das regiões conhecidas como cintura pélvica e cintura escapular (SHIMOYAMA et al. 2010). Os desmóides abdominais são encontrados tipicamente nos músculos da parede abdominal, e ocorrem principalmente durante a gravidez ou período puerperal (ROBINSON et al. 2012). Os tumores desmóides intra-abdominais normalmente afetam o mesentério, que é o tecido que prende as alças intestinais à parede interna da cavidade abdominal (WRONSKI et al. 2012; LI DESTRI et al. 2014; BN et al. 2015) (**Figura 2**). Dependendo da sua localização, os tumores desmóides podem se infiltrar em órgãos adjacentes, comprimir vasos sanguíneos e nervos ou, até mesmo, obstruir órgãos como o intestino (BERRI et al. 2011). TDs ocorrem principalmente na faixa etária entre 15 e 60 anos, com pico na faixa etária de cerca de 30 anos (KASPER et al. 2011).

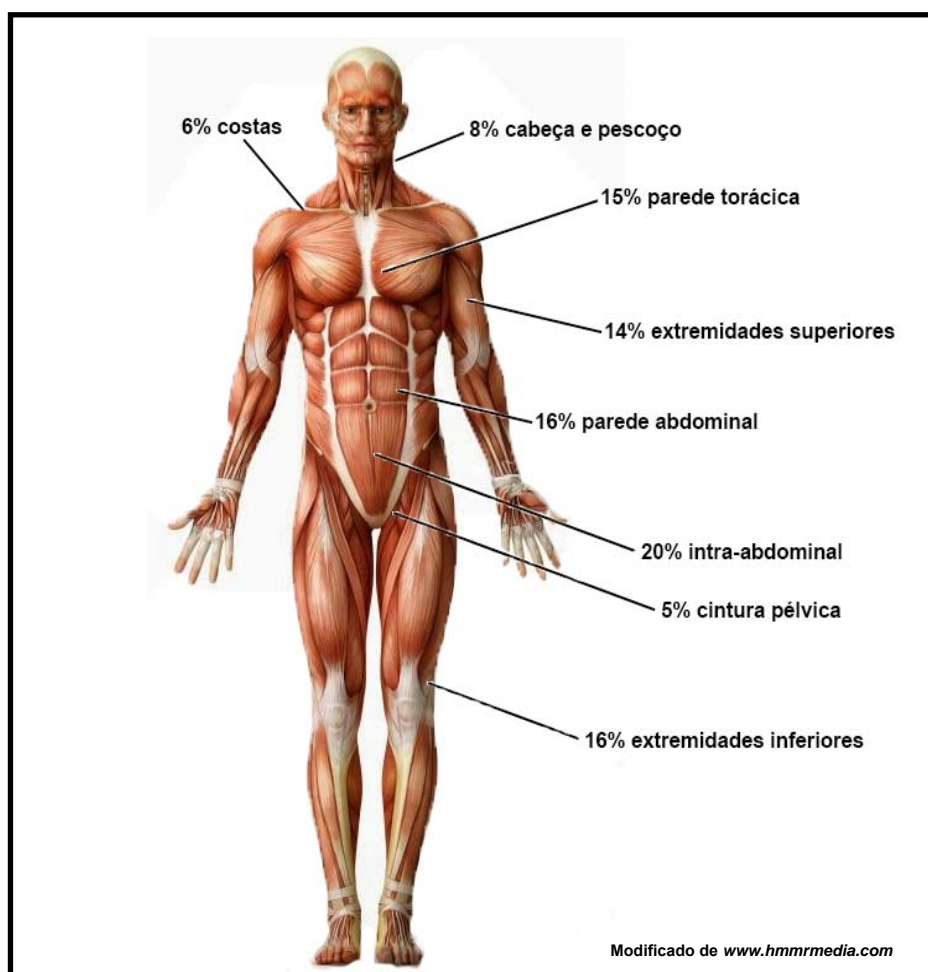


Figura 2 - Localização dos tumores desmóides. Figura esquemática mostrando a frequência e a localização onde a maioria dos tumores desmóides ocorrem.

1.2 DIAGNÓSTICO

Independente da localização anatômica, os tumores desmóides compartilham das mesmas características macroscópicas e microscópicas. TDs são frequentemente grandes, com bordas infiltrativas.

A modalidade de escolha para o diagnóstico, avaliação da extensão dos tumores e exames de acompanhamento é a ressonância magnética,

embora a tomografia computadorizada possa ser valiosa, especialmente para os locais intra-abdominais (LEE et al. 2006).

Clinicamente, os principais diagnósticos diferenciais são os sarcomas de parte moles, linfomas (extranodal), miosite ossificante e malformações arteriovenosas. De maneira geral, é possível excluir adequadamente as doenças mencionadas com os tumores desmóides através do exame de imagem, mas a diferenciação entre os tumores desmóides e os sarcomas malignos permanece um desafio (LEE et al. 2006). O diagnóstico definitivo é estabelecido pela histologia.

Histologicamente, o diagnóstico diferencial inclui fibrossarcoma, sarcoma fibromixóide de baixo grau, leiomiossarcoma de baixo grau, tumores estromais gastrointestinais (GISTs), fibroma desmoplásico, mixoma, fascíte nodular e o próprio tecido cicatricial (MENDENHALL et al. 2005; PAPAGELOPOULOS et al. 2006). Por conta da similaridade entre os tumores desmóides e o tecido cicatricial, a distinção entre uma recorrência do tumor desmóide e o simples processo de cicatrização no local de uma ressecção anterior pode ser muito difícil. Com o objetivo de ajudar no diagnóstico diferencial, a imuno-histoquímica para β -catenina vem sendo utilizada, uma vez que os tumores desmóides, em geral, apresentam positividade nuclear para β -catenina (**Figura 3**).

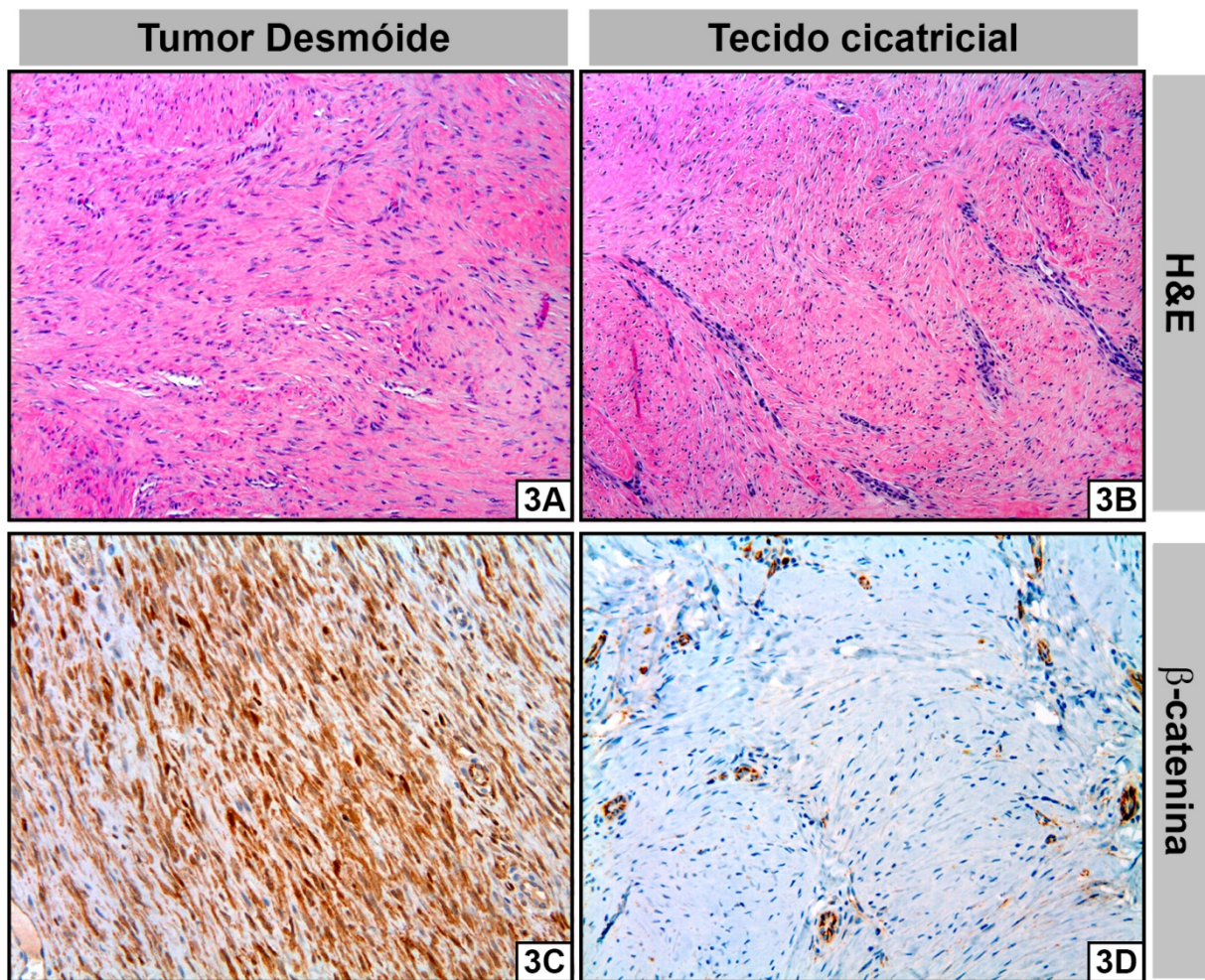


Figura 3 - Imuno-histoquímica para α -catenina. Coloração de H&E mostrando a similaridade histológica entre os tumores desmóides (3A) e o tecido cicatricial (3B). Entretanto, uma intensa positividade nuclear para α -catenina pode ser observada no tumor desmóide (3C), mas não no tecido cicatricial (3D).

1.3 ETIOLOGIA

O conhecimento dos fatores etiológicos e da patogênese é de importância fundamental para o tratamento médico e para o desenvolvimento de novas drogas terapêuticas. Entretanto, a etiologia dessa neoplasia mesenquimal ainda não é totalmente conhecida. Vários fatores já

foram relatados como sendo fortemente associados com o seu desenvolvimento.

Os tumores desmóides geralmente ocorrem esporadicamente, mas, em cerca de 5% dos casos, estão associados à polipose adenomatosa familiar (FAP) (STURT et al. 2004). Esses tumores são o resultado do crescimento desregulado do tecido conjuntivo. Como dito anteriormente, o aumento da expressão nuclear de β -catenina, uma proteína responsável pela regulação da expressão gênica, proliferação e sobrevivência celular, é característico tanto nos desmóides esporádicos quanto nos associados à FAP.

A polipose adenomatosa familiar é uma doença hereditária, autossômica dominante, com penetrância próxima de 100%. De maneira geral, os pacientes portadores dessa síndrome desenvolvem de centenas a milhares de pólipos adenomatosos pré-malignos (LEOZ et al. 2015). Se não forem tratados a tempo, a maioria desses pacientes irá desenvolver câncer de colorretal. Estudos mostram que a FAP é responsável por aproximadamente 1% de todos os casos de câncer de colorretal (BURT et al. 1990).

Uma porcentagem significativa (3.5-32%) dos pacientes com polipose adenomatosa familiar irá desenvolver pelo menos um tumor desmóide durante a sua vida (BERTARIO et al. 2003; NIEUWENHUIS et al. 2011a). A incidência dos tumores desmóides nos pacientes portadores de FAP foi estimada em aproximadamente 850 vezes maior do que na população em geral (FONG et al. 1993). Na maioria dos casos, os desmóides ocorrem após cirurgia profilática para retirada dos pólipos característicos da síndrome

FAP, sendo o trauma cirúrgico o provável gatilho para o desenvolvimento dos tumores desmóides nos pacientes com polipose adenomatosa familiar (LATCHFORD et al. 2006). Entretanto, em alguns casos, o tumor desmóide pode ser a primeira manifestação da síndrome FAP. Cerca de 4% dos casos de desmóides associados à FAP são encontrados como um achado incidental no momento da cirurgia primária para retirada dos pólipos (SLEIJFER 2009).

Nos pacientes com polipose adenomatosa familiar, o desenvolvimento dos tumores desmóides está relacionado a mutações germinativas inativadoras do gene supressor tumoral polipose coli adenomatosa (*APC*), que resulta na acumulação de β -catenina. Já nos casos de tumores desmóides esporádicos, aproximadamente 85% dos casos apresentam mutações somáticas ativadoras no gene *CTNNB1*, que codifica para a proteína β -catenina (GURBUZ et al. 1994; ALMAN et al. 1997; LI et al. 1998; MIYOSHI et al. 1998; TEJPAR et al. 1999).

1.4 FATORES DE RISCO

Em relação aos fatores de risco associados ao desenvolvimento dos tumores desmóides, o trauma causado pela cirurgia tem sido apontado como um fator de risco, uma vez que diversos estudos mostram que em aproximadamente 25% dos casos de tumores desmóides havia um trauma anterior, na maioria dos casos trauma pós-cirúrgico (SCHLEMMER 2005; NIEUWENHUIS et al. 2011b). Nos pacientes portadores da síndrome FAP a

taxa de risco parece ser ainda maior. Em até 5 anos após cirurgia abdominal, aproximadamente 84% desses pacientes desenvolvem tumores desmóides associados ao trauma pós-cirúrgico (BERTARIO et al. 2001). Já foram relatados casos de desmóides que se desenvolveram após vários procedimentos, tais como toracotomia, colocação de cateter, gastrectomia, implante de silicone, transplante de fígado e etc. (SKHIRI et al. 2004; FLEETWOOD et al. 2014; KIM et al. 2014; SHIM et al. 2014; ENDO et al. 2015).

Ainda em relação à ocorrência dos tumores desmóides, o hormônio estrogênio também parece estar relacionado à tumorigênese desses tumores. Alguns estudos já mostraram que os desmóides que acometem mulheres em idade fértil tem uma taxa de crescimento maior do que os que acometem homens ou mulheres na pré ou pós-menopausa (MICHOPLOU et al. 2010; ROBINSON et al. 2012). Além disso, já foi demonstrado um aumento da ocorrência de TDs durante a gravidez e em mulheres que usam contraceptivos orais (REITAMO et al. 1986; SHIELDS et al. 2001). Outro fator que sugere a influência do hormônio estrogênio na tumorigênese dos tumores desmóides é o relato de regressão tumoral após tratamento com tamoxifeno (OHASHI et al. 2006; PLAZA e YEPES 2012; SKAPEK et al. 2013).

Já em relação aos fatores de risco associados à recorrência, a localização tumoral parece exercer um papel importante na predição de recorrência. Estudos mostram que os tumores desmóides que se desenvolvem nas extremidades são localmente agressivos e apresentam

uma taxa de recorrência local que pode variar de 24 a 77%. Já as taxas de recorrência local para os desmóides intra-abdominal são mais elevadas do que para tumores extra-abdominais (GRONCHI et al. 2003; PENG et al. 2012). Ao contrário de outros tumores, a idade não se apresenta como fator de prognóstico nos tumores desmóides (PIGNATTI et al. 2000). Outros fatores como sexo e o status da margem pós-cirurgia ainda são considerados incertos como preditores de recorrência local, devido aos resultados controversos encontrados por diferentes estudos (GRONCHI et al. 2003; NUYTTENS et al. 2000).

1.5 TRATAMENTO

O melhor tratamento deste tumor ainda não é determinado. Tradicionalmente, a cirurgia tem sido o pilar terapêutico no tratamento dos tumores desmóides. No entanto, dada a importância do sítio tumoral e da variabilidade da evolução clínica, a aplicação e uso de intervenção cirúrgica tem sido amplamente discutida e debatida na recente literatura (MELIS et al. 2008; NAKAYAMA et al. 2008; SHIDO et al. 2009). Recentemente, vários centros especializados no tratamento dos tumores desmóides têm adotado uma abordagem conhecida como “vigilância e espera”. Vários estudos têm mostrado taxas de sobrevida livre de progressão em 5 anos de aproximadamente 50% para os pacientes tratados com essa nova abordagem (BONVALOT et al. 2008; FIORE et al. 2009; BRIAND et al. 2014).

Quando ocorre a progressão tumoral, a cirurgia ainda é uma opção válida, entretanto, como é potencialmente mutilante e com altas taxas de recidiva local, tratamentos não cirúrgicos têm sido investigados, embora geralmente esses estudos não sejam realizados em um padrão de ensaio clínico controlado. Atualmente, a primeira linha de tratamento não cirúrgico utilizado nos tumores desmóides é a terapia alvo utilizando o sorafenibe, que inibe os receptores KIT, PDGFR e VEGFR (GOUNDER et al. 2011). Diversos trabalhos já correlacionaram a expressão da proteína VEGF com uma maior atividade de β -catenina (COHEN et al. 1999; MAES et al. 2010), entretanto, não existem estudos mostrando que a resposta dos tumores desmóides ao sorafenibe está relacionada à inibição do receptor VEGFR.

Além do sorafenibe, outros tratamentos utilizados nos tumores desmóides incluem terapia anti-hormonal, uso de anti-inflamatórios não esteroide, terapia alvo (como o uso do mesilato de imatinibe), quimioterapia tradicional e radioterapia (JANINIS et al. 2003). As respostas clínicas foram observadas apenas em um subconjunto de casos, porém marcadores preditivos de resposta não foram encontrados. Por exemplo, estudos têm mostrado que praticamente todos os tumores desmóides expressam o receptor de estrogênio β , mas apenas um pequeno conjunto responde a terapias contra esse alvo (DEYRUP et al. 2006).

A avaliação da eficácia das várias modalidades de tratamento é complicada pela raridade e heterogeneidade da doença. Até o momento não existem estudos grandes ou randomizados para avaliar adequadamente as várias modalidades de tratamento. A avaliação da resposta ao tratamento

também é complicada pela própria história natural imprevisível dos tumores desmóides.

1.6 DESREGULAÇÃO DA VIA DE WNT/ β -catenina NOS TUMORES DESMÓIDES

As investigações relacionadas aos tumores desmóides associados com a síndrome FAP levaram a um melhor conhecimento da desregulação da via de Wnt/APC/ β -catenina e sua importância na tumorigênese dos tumores desmóides (BERTARIO et al. 2003). Como consequência dessas investigações iniciais, mutações somáticas do gene *APC* foram identificadas em um pequeno grupo de desmóides esporádicos. Posteriormente e, mais importante, mutações no gene *CTNNB1* (que codifica para β -catenina) foram identificadas com uma prevalência elevada, de aproximadamente 85%, nos tumores desmóides esporádicos (AMARY et al. 2007). A desregulação da via β -catenina, juntamente com a estabilidade genômica encontrada nos tumores desmóides, sugere que esta via tem um papel fundamental na tumorigênese desses tumores.

APC e β -catenina são componentes fundamentais da via canônica de Wnt (LOGAN e NUSSE 2004). O termo Wnt é derivado da combinação do gene *Wingless*, responsável pelo desenvolvimento das asas em *Drosophila*, com o proto-oncogene *Int-1*, responsável pelo desenvolvimento de tumores mamários quando ativado em camundongos. A via de Wnt é fisiologicamente importante no desenvolvimento de diversos organismos. Embora os

componentes desta via possam diferir entre os diversos organismos, o ponto em comum dessa via entre todos os organismos é a regulação da transcrição gênica mediada pela β -catenina (POLAKIS 2000a). A via canônica de Wnt/ β -catenina apresenta um papel duplo em células epiteliais, agindo como uma molécula de adesão celular em junções aderentes e também no processo de transcrição no núcleo (BARKER 2008). Nas células mesenquimais, como as que compõem os tumores desmóides, apenas este último papel é importante.

Normalmente, os níveis de β -catenina são controlados através de um complexo conhecido como complexo de destruição, que mantém a β -catenina fora do núcleo enquanto promove sua degradação. Na ausência de um sinal Wnt, a β -catenina se liga ao complexo de destruição e através da fosforilação é degradada pelo proteossomo. O complexo de destruição é formado por pelo menos 4 proteínas: uma serina/treonina quinase, conhecida como caseína quinase 1 (CK1), que fosforila a serina 45 da β -catenina, marcando-a assim para ser fosforilada na treonina 41 e sequencialmente nas serinas 37 e 33 por outra serina/treonina quinase, conhecida como glicogênio sintase quinase 3 beta (GSK-3 β). Essa última fosforilação é responsável por marcar a proteína β -catenina para ubiquitinação, que resulta em sua degradação pelo proteossomo. A proteína APC, juntamente com outra proteína conhecida como axina, é responsável por estabilizar o complexo de destruição (XU e KIMELMAN 2007). Na ausência de β -catenina no núcleo, as proteínas fator celular-T (TCF)/fator intensificador do linfócito (LEF) se ligam aos co-repressores Gro/TLE e

CtBP, resultando na supressão ativa da transcrição de genes alvos. As proteínas TCF/LEF são proteínas que atuam como adaptadores, se ligando ao DNA e curvando o mesmo, o que permite que outros fatores de transcrição se liguem e alterem a transcrição de genes alvos. Ambos Gro/TLE e CtBP interagem com histona deacetilases para silenciar transcrição de determinados genes, através da alteração da estrutura da cromatina (COUREY e JIA 2001).

A ativação da via Wnt/ β -catenina se dá após a ligação do ligante Wnt aos receptores de superfície celular, que incluem 7 proteínas transmembranares chamadas de *Frizzled* e os co-receptores LRP5 e LRP6, que são proteínas de baixa densidade relacionadas com o receptor LDL. Quando ativadas pela ligação de Wnt, os receptores recrutam e fosforilam uma proteína citoplasmática chamada dishevelled (DVL). A proteína dishevelled, quando fosforilada, previne a fosforilação da β -catenina pelo complexo APC/AXINA/CK1/GSK-3 β (KIKUCHI et al. 2007). A β -catenina não-fosforilada se acumula no citoplasma e, em seguida, se transloca para o núcleo. Uma vez no núcleo, a β -catenina se liga a membros da família TCF/LEF para formar um complexo estável através do deslocamento de Gro/TLE (DANIELS e WEIS 2005), o que permite que a β -catenina recrute uma variedade de coativadores que são necessários para a sua atividade transcricional, resultando na ativação da transcrição de genes, tais como CYCD1 e MYC que, em geral, promovem a proliferação e sobrevivência celular e, em alguns contextos, a diferenciação celular.

A via Wnt desempenha um papel importante em diversos processos, tais como desenvolvimento de órgãos, manutenção dos tecidos epiteliais e cicatrização de feridas (BARKER 2008; CHEON et al. 2002). Em processos fisiológicos, a via Wnt é estritamente regulada, entretanto, qualquer interrupção desse processo, seja causado por mutação ou por aumento de expressão gênica, permite a acumulação de β -catenina no núcleo e, conseqüentemente, pode promover a tumorigênese (**Figura 4**).

1.7 MUTAÇÕES NA VIA WNT NOS TUMORES DESMÓIDES

Como normalmente ocorre com outras importantes vias celulares e moleculares, a via de sinalização Wnt frequentemente se encontra desregulada em diversas neoplasias, uma vez que sua desregulação proporciona um aumento no crescimento e na sobrevivência celular (POLAKIS 2000b). Entre as várias proteínas envolvidas na via Wnt, já foram relatadas mutações nas proteínas β -catenina, APC e AXINA em diversos tipos tumorais, sugerindo um possível papel da mutação em componentes dessa via na tumorigênese (KIKUCHI 2003; POLAKIS 2007). Uma vez que os tumores desmóides, em alguns aspectos se assemelham a um processo de cicatrização descontrolada e que a via de Wnt desempenha um papel fisiológico importante na cicatrização de feridas, supõe-se que a desregulação desta via é de extrema importância na tumorigênese dos tumores desmóides.

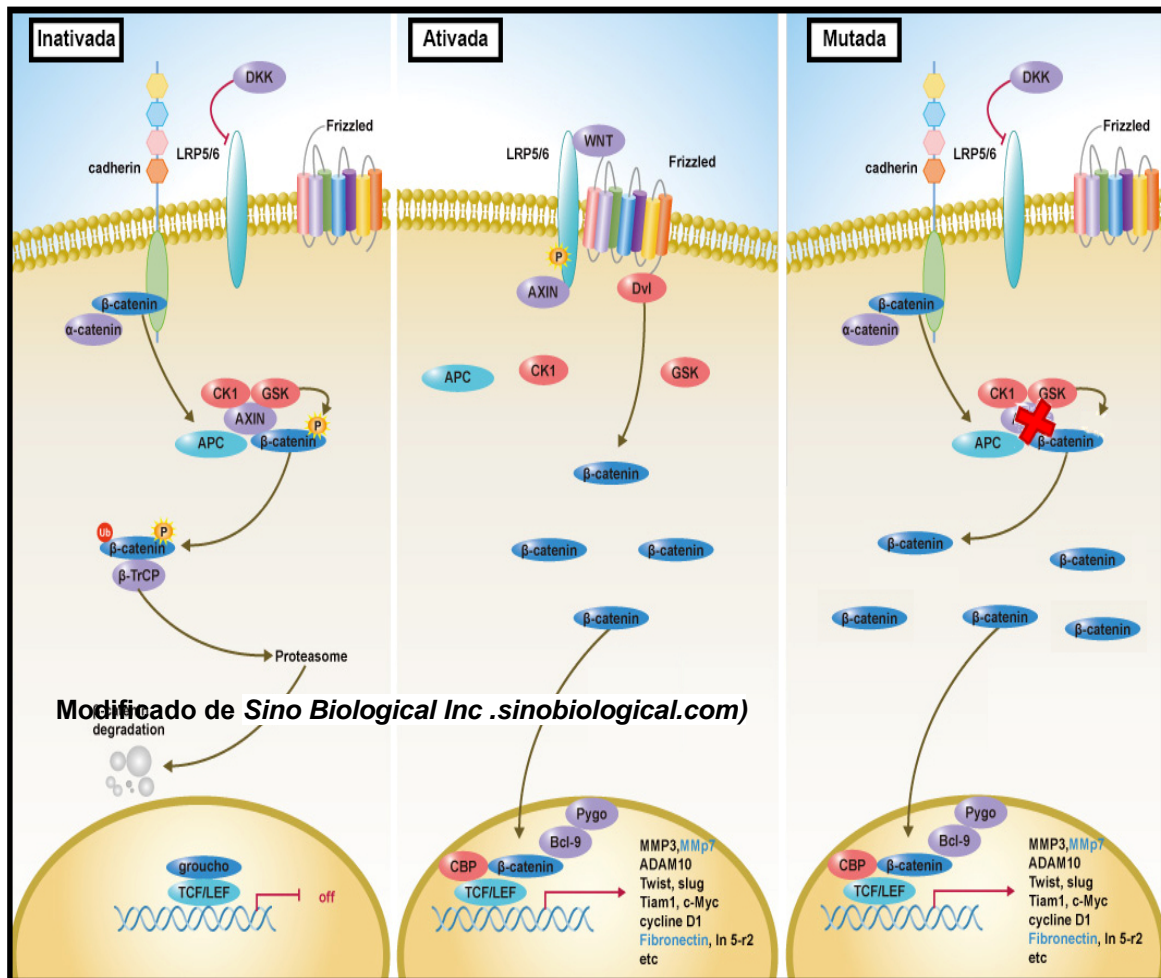


Figura 4 – Via canônica de sinalização de Wnt/β-catenina. Na ausência do ligante Wnt, a proteína β-catenina é fosforilada pelo complexo de destruição e destruída no proteossoma. Na presença do ligante, o complexo de destruição é inibido e a β-catenina não fosforilada se acumula no núcleo, levando à ativação de diversos genes. Quando os genes *CTNNB1* ou *APC* se encontram mutados, a sequência de fosforilação da proteína β-catenina não pode ser realizada. Dessa forma, β-catenina se torna estável e se transloca para o núcleo, levando à transcrição de diversos genes.

1.7.1 APC

O gene *APC* foi o primeiro gene identificado mutado nos tumores desmóides. Esse gene está localizado no cromossomo 5q21 (LEPPERT et al. 1987). Este gene é composto por 21 éxons, sendo o maior de todos o éxon 15, que compreende mais de 75% de toda a sequência codificadora

(GOSS e GRODEN 2000). Várias isoformas desse gene já foram relatadas. Essas isoformas parecem ser específicas de alguns tecidos, entretanto a função exata de cada isoforma ainda é desconhecida (HORII et al. 1993; PYLES et al. 1998). Três regiões são consideradas fundamentais na estrutura protéica do APC. Essas regiões incluem a região N-terminal, que contém sete domínios *armadillo* homólogos os domínios da β -catenina (RUBINFELD et al. 1995), a região central, que está associada à ligação com AXINA, desempenhando assim um papel essencial na sinalização mediada por β -catenina, e, por último, a região C-terminal, que é essencial para a ligação do APC com a tubulina (MUNEMITSU et al. 1994) (**Figura 5**).

O papel de APC na degradação de β -catenina ainda não é completamente compreendido. No câncer colorretal, a super-expressão da proteína AXINA é suficiente para reduzir a expressão de β -catenina, indicando que APC tem um papel importante, mas não essencial na regulação da β -catenina. De acordo com o modelo proposto por BIENZ et al., APC se liga à β -catenina no citoplasma e no núcleo e a transfere para onde ela possa se ligar ao complexo de destruição ou à E-caderina (BIENZ e CLEVERS 2000). A identificação de uma expressão nuclear aberrante da proteína APC nos tumores de Wilms, recapitulando os primeiros estágios de diferenciação do rim (MASCHIETTO et al. 2008), corroboram estudos anteriores que mostraram que a localização nuclear do APC pode estar implicada na exportação da β -catenina nuclear, como tentativa de desativar a via Wnt (NEUFELD et al. 2000; HENDERSON e FAGOTTO 2002).

Entretanto, não há relatos de expressão nuclear de APC nos tumores desmóides.

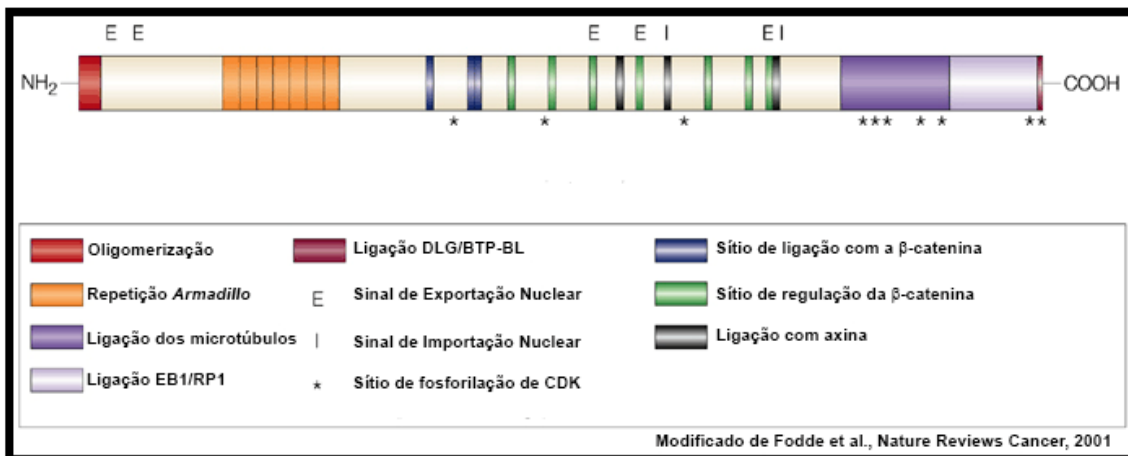


Figura 5 - Regiões do gene *APC*. As principais regiões que compõem o gene *APC* estão representadas nessa figura, tais como as repetições *armadillo*, e regiões que interagem com outras proteínas, como a β -catenina.

Mutações pontuais inativadoras no gene *APC* são comuns e estão presentes na maioria dos pólipos e carcinomas colorretal esporádicos (MIYOSHI et al. 1992; SCHIROSI et al. 2013; ZAUBER et al. 2014). Já foram relatadas mais de 1.600 mutações no gene *APC*, tanto mutações germinativas, quanto esporádicas, e, em menor frequência, grandes deleções que incluem o gene *APC* (TORREZAN et al. 2012). A maioria das mutações pontuais resulta em um códon de parada precoce e em uma proteína truncada, que, dessa forma, não consegue auxiliar na fosforilação e degradação de β -catenina (GOSS e GRODEN 2000). Enquanto as mutações germinativas podem ser encontradas por toda a extensão do gene *APC*, as mutações esporádicas são frequentemente encontradas em uma pequena região da extremidade 5' do gene *APC*, que é essencial para a

interação de APC com β -catenina e Axina (RUBINFELD et al. 1995; KISHIDA et al. 1998). Curiosamente, o genótipo da mutação do gene *APC* correlaciona-se com fenótipo da doença e suas manifestações clínicas. Mutações entre os códons 1249 e 1330 estão associados a uma forma mais grave de FAP, com um início precoce do câncer de colorretal e um grande número de pólipos (GOSS e GRODEN 2000), ao passo que as mutações que ocorrem entre os códons 1445-1578 estão associados a um fenótipo menos grave, mas com um aumento da frequência de tumores desmóides (CASPARI et al. 1995). Notavelmente, as correlações genótipo-fenótipo não são sistematicamente observadas em famílias de APC-positivos em todas as populações, como mostra o estudo em pacientes brasileiros, que apresentou divergência especialmente na associação de entre os códons 1445-1578 com a ocorrência de tumores desmóides, uma vez que na grande maioria dos pacientes brasileiros as mutações se encontravam antes do codon 1444 (TORREZAN et al. 2013).

A maioria dos tumores desmóides associados à FAP localiza-se no mesentério, embora um caso de desmóide extra-abdominal já tenha sido relatado (GROEN et al. 2008). Assim como no câncer colorretal, o local da mutação do gene *APC* também pode ser um fator na determinação da agressividade dos tumores desmóides. Mutações germinativas na extremidade 3' do gene *APC* foram associadas a um fenótipo mais agressivo, caracterizado pela presença de vários desmóides no tronco e extremidades com uma taxa de penetração de 100% (COUTURE et al. 2000). Curiosamente, embora os adenomas e os tumores desmóides

associados à síndrome FAP tenham como evento inicial a mutação no gene *APC*, os adenomas podem progredir para um câncer maligno altamente agressivo, enquanto os tumores desmóides não tem essa capacidade (MIYAKI et al. 2008). Este fato pode ser explicado pela diferença na origem celular desses dois tumores ou pela ativação de diferentes alvos abaixo de β -catenina.

Mutações no gene *APC* também ocorrem em 5-10% dos casos de tumores desmóides esporádicos. Essas mutações se desenvolvem em pacientes que não possuem mutação germinativa em *APC*. Além disso, estudos citogenéticos mostraram a ocorrência de deleções parciais no braço longo do cromossomo 5, onde o gene *APC* está localizado em alguns desmóides (BRIDGE et al. 1992; FLETCHER et al. 1995).

1.7.2 *CTNNB1*

β -catenina humana, um homólogo da proteína *Armadillo* encontrada nas *Drosophilas*, é uma proteína multifuncional que desempenha um papel essencial no desenvolvimento e na manutenção dos tecidos (CLEVERS e NUSSE 2012). Esta proteína de 92 kDa é codificada pelo gene *CTNNB1*, que encontra-se no cromossomo 3p21 (KRAUS et al. 1994). A β -catenina é composta por três domínios principais: um domínio N-terminal, no qual se encontra o sítio de ligação para α -catenina e os sítios de fosforilação para a GSK-3 β , um domínio central de repetição de *armadillo*, no qual se encontra sítios de ligações para TCF/LEF, APC, AXINA, e E-caderina, e um domínio C-terminal, que também desempenha um papel importante na co-ativação

transcricional de TCF/LEF (GOTTARDI e GUMBINER 2004) (**Figura 6**). Funcionalmente, a β -catenina está envolvida em dois processos importantes de desenvolvimento: o primeiro são as interações célula-célula, através de junções aderentes, por meio de ligação à E-caderina e à α -catenina na superfície celular, e o segundo é a regulação da expressão gênica através da ativação da via Wnt, que resulta na translocação de β -catenina para o núcleo e na interação com os reguladores de transcrição da família TCF/LEF (BARKER 2008).

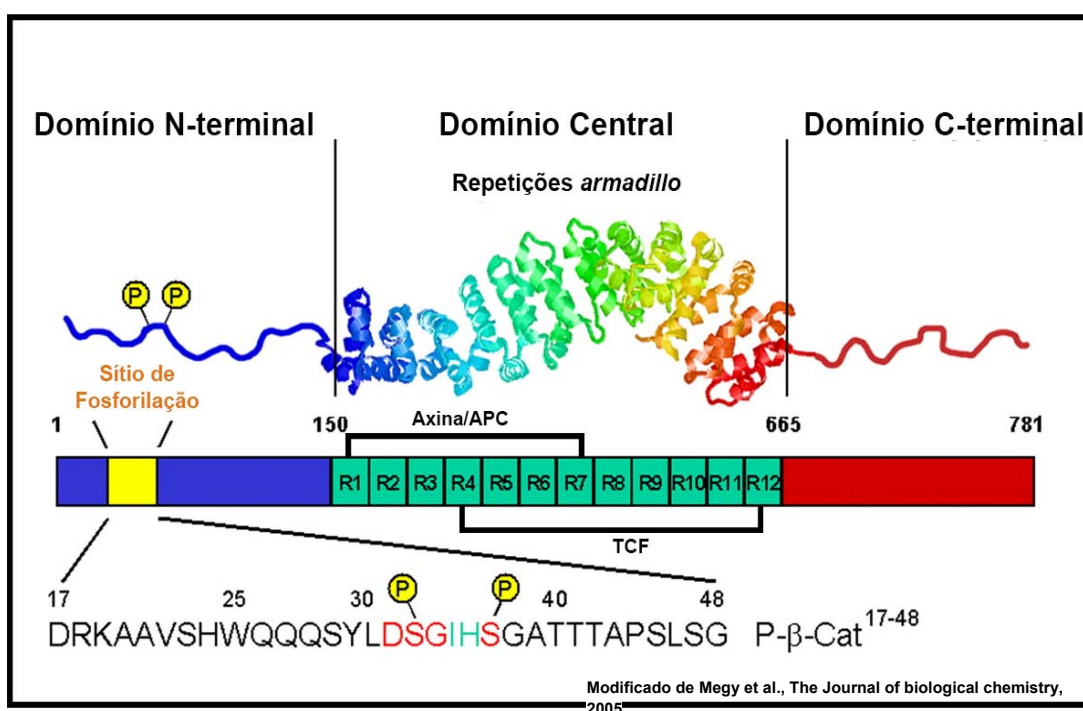


Figura 6 - Regiões da β -catenina. As principais regiões que compõem a β -catenina estão representadas nessa figura, tais como as repetições *armadillo*, e regiões de ligação com APC/Axina e TCF.

Estudos anteriores mostraram que a β -catenina possui dois domínios de transativação, um conhecido como domínio de ativação N-terminal (NTAD) e o outro conhecido como domínio de ativação C-terminal (CTAD) (HECHT et al. 1999; WILLERT e JONES 2006). Cada um destes domínios é capaz de estimular a expressão gênica de forma potente. Em particular, o CTAD foi identificado como suficiente tanto para sinalização quanto para a transformação oncogênica (AOKI et al. 1999).

O fato da expressão protéica da β -catenina se apresentar elevada em praticamente todos os tumores desmóides esporádicos, apesar de aproximadamente 10% dos desmóides serem selvagens para a mutação do gene *CTNNB1* e *APC*, conduziu a procura de outros possíveis fatores relacionados às desregulações da via Wnt. Estas investigações mostraram que as mutações no gene *CTNNB1* são muito frequentes nos tumores desmóides esporádicos (MIYOSHI et al. 1998) e que as mutações dos genes *CTNNB1* e *APC* são mutuamente exclusivas (SPARKS et al. 1998).

Mutações no gene *CTNNB1* já foram descritas em diversos tipos de câncer, entre eles o carcinoma colorretal, o carcinoma hepatocelular, o câncer de pâncreas, o câncer gástrico, o melanoma, o hepatoblastoma e os tumores de Wilms (MIRABELLI-PRIMDAHL et al. 1999; POLLOCK e HAYWARD 2002; LI et al. 2004; ZENG et al. 2006; PAN et al. 2008; TORNESELLO et al. 2013; TORREZAN et al. 2014; KOSAKI et al. 2014). As mutações no gene *CTNNB1* ocorrem quase exclusivamente no éxon 3, na região que codifica o domínio de fosforilação da β -catenina. As mutações nessa região inibem a fosforilação sequencial da β -catenina, impedindo que

esta seja regulada pelo complexo de destruição, resultando na estabilização e acumulação nuclear da β -catenina (LAZAR et al. 2008).

Curiosamente, nos tumores desmóides esporádicos apenas três mutações pontuais em dois códons diferentes (41 e 45) são quase sempre identificados nos pacientes com mutação para o gene *CTNNB1*: ACC para GCC no códon 41 (T41A; substituição de treonina por alanina); TCT para TTT no códon 45 (S45F; substituição de serina por fenilalanina) e a TCT para CCT no códon 45 (S45P; substituição de serina por prolina) (LAZAR et al. 2008). Esses dois códons são alvo de fosforilação por GSK-3 β e CK1, respectivamente. Em contraste, a maioria das outras neoplasias que apresentam mutações no éxon 3 do gene *CTNNB1* exibem uma variedade muito mais ampla de mutações em múltiplos códons críticos (WILLERT e NUSSE 1998; CLEVERS e NUSSE 2012). Esse fato indica que as mutações em *CTNNB1* encontradas nos tumores desmóides podem afetar ou até mesmo alterar as propriedades de sinalização de β -catenina de maneiras que são favoráveis à tumorigênese dos tumores desmóides.

Devido à alta frequência de mutação no gene *CTNNB1* nos tumores desmóides esporádicos, relatada em aproximadamente 85%, diversos estudos avaliaram o papel da análise mutacional da β -catenina como uma potencial ferramenta diagnóstica para os desmóides. Os resultados mostraram que a análise mutacional da β -catenina pode ser muito útil em lesões de difícil diagnóstico onde o diagnóstico diferencial incluía tumores desmóides (COLOMBO et al. 2011; LE GUELLEC et al. 2012).

O papel das diferentes mutações no gene *CTNBB1* um prognóstico de doença também foi avaliado. Diversos estudos realizados em diversas instituições diferentes mostraram que tumores desmóides com mutações no códon 45 do gene *CTNBB1* (S45F) apresentavam significativamente um risco maior de recidiva (LAZAR et al. 2008; BO et al. 2012; COLOMBO et al. 2013; VAN BROEKHOVEN et al. 2015). Além disso, a mutação S45F também se mostrou como um marcador de prognóstico, uma vez que os pacientes portadores dessa mutação apresentaram uma significativa resposta pior ao tratamento com meloxicam (HAMADA et al. 2014).

As mutações de perda de função do gene *APC* e ganho de função no gene *CTNBB1* resultam na acumulação nuclear de β -catenina. Muitas proteínas codificadas pelos alvos de transcrição β -catenina/TCF podem afetar a transformação neoplásica, impactando na proliferação, diferenciação, sobrevivência, migração e invasão das células tumorais. Grande parte do conhecimento sobre câncer associado à desregulação da via de sinalização da β -catenina resulta de estudos de câncer de colorretal, onde foi identificada uma super-expressão de alvos transcricionais que na via Wnt se encontram abaixo da β -catenina tais como: CCND1, c-MYC, MMP-7, fascina, CX43, ITF2, PPAR- (MORIN e WEERARATNA 2003). Entretanto, os mecanismos moleculares que resultam na transcrição gênica induzida por β -catenina não estão bem caracterizados nos tumores desmóides. Alguns genes alvo da β -catenina identificados no câncer de colorretal, tais como *PPAR γ* , *c-MYC*, *c-JUN*, foram avaliados nos tumores desmóides, no entanto os resultados mostraram que esses genes não se

apresentavam regulados positivamente nos desmóides (TEJPAR et al. 1999). Uma possível explicação para essa diferença é que β -catenina se liga a diferentes fatores de transcrição em diferentes tipos tumorais. De maneira diferente do que ocorre em outros tipos tumorais, nos desmóides foi identificado que a β -catenina se liga TCF3 (MORIN et al. 1997). Genes alvo da β -catenina/TCF3 nos tumores desmóides ainda são desconhecidos, dessa forma estudos moleculares de larga escala podem ser úteis como uma estratégia para identificar esses genes que até agora não foram determinados e que podem ter um papel importante na tumorigênese dos tumores desmóides.

1.8 O POTENCIAL TERAPÊUTICO DA VIA DE SINALIZAÇÃO WNT

O padrão de crescimento lento dos tumores desmóides e a falta de capacidade de gerar metástase sugerem que esses tumores podem ser bons candidatos para terapias alvo-molecular. Com base nos dados citados ao longo desse trabalho, o bloqueio da via de sinalização de β -catenina aparece como uma abordagem terapêutica atraente para o tratamento dos tumores desmóides. Inibir sinalizações cruciais na via de β -catenina, nas quais as células tumorais dos desmóides podem ser dependentes, potencialmente pode provocar efeitos significativos no combate a essa doença. No entanto, agentes que atuem diretamente na regulação negativa da β -catenina ainda não existem. No entanto, tais agentes, quando

desenvolvidos, caso não sejam inibidores seletivos, dificilmente serão úteis clinicamente devido ao comprometimento do funcionamento fisiológico da β -catenina normal (LEPOURCELET et al. 2004). Por essas razões, o desenvolvimento de inibidores moleculares de eventos relacionados à estabilização da β -catenina, como localização nuclear, a interação proteína-proteína, a atividade de transcrição ou inibição de genes alvos específicos de β -catenina pode ser mais atraente.

A identificação de novos genes alvo da β -catenina pode oferecer novas oportunidades para desenvolvimento de agentes terapêuticos que resultem em terapias-alvos, que possam ajudar no controle dessa doença com menos efeitos secundários.

1.9 SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO COMO ESTRATÉGIA PARA IDENTIFICAÇÃO DE NOVAS MUTAÇÕES

Na busca pela identificação de novas alterações genéticas, o sequenciamento completo dos genes vem sendo apontado como a técnica de maior sensibilidade e o padrão ouro para identificação e localização de novas mutações esporádicas.

Atualmente, novas tecnologias de sequenciamento, chamadas de sequenciamento de nova geração (NGS), e várias plataformas de captura do exoma humano para o sequenciamento paralelo massivo estão sendo comercializadas (GLEESON et al. 2015; HECHTMAN et al. 2015; PAIK et al. 2015). Essas plataformas utilizam diferentes metodologias, mas todas elas

são capazes de gerar informação sobre milhões de pares de bases em uma única corrida (ABECASIS et al. 2012). Dentre todas as metodologias, as mais utilizadas consistem nas plataformas Illumina (<http://www.illumina.com>), SOLID System (<http://www.appliedbiosystems.com>), Ion Torrent (<http://www.appliedbiosystems.com>) e Ion Proton (<http://www.appliedbiosystems.com>).

Vários trabalhos já demonstraram a grande aplicabilidade dessas plataformas nos estudos moleculares, tais como na identificação de novas alterações genéticas (MOROZOVA e MARRA 2008; TORREZAN et al. 2014; ZHOU et al. 2015b), como teste de diagnóstico e monitoramento molecular (CHANDRANI et al. 2015; DUNCAVAGE e TANDON 2015) e no sequenciamento de genomas completos (WHEELER et al. 2008; QUEZADA-ROMEGIALLI et al. 2015). Dessa forma, a utilização do sequenciamento de nova geração pode ser uma ferramenta de grande utilidade na busca de mutações até o momento desconhecidas nos tumores desmóides.

1.10 JUSTIFICATIVA

Nos últimos anos, os avanços nos estudos de biologia molecular e genética dos tumores desmóides permitiram o estabelecimento de uma forte associação entre a presença de mutações esporádicas no gene *CTNNB1* e germinativas no gene *APC* e o risco de desenvolver tumores desmóides.

Em conjunto, as mutações nos genes *APC* e *CTNNB1* podem ser identificadas na grande maioria dos tumores desmóides. No entanto, é

importante ressaltar que em 5-10% dos desmóides nenhuma destas mutações são identificadas, mesmo nos casos onde o aumento da expressão nuclear de β -catenina é observada. Com o advento das plataformas de sequenciamento de nova geração, o nível de sensibilidade para captar e caracterizar alterações presentes nos tumores atingiu um nível anteriormente inviável, o que pode levar a um melhor entendimento da desregulação da via Wnt nos tumores desmóides.

A caracterização da causa genética que leva ao desenvolvimento de tumores desmóides e do processo de acúmulo de mutações somáticas que ocorrem durante a evolução do tumor pode auxiliar na maior compreensão do processo de tumorigenese e no estabelecimento de estratégias de diagnóstico e tratamento.

Apesar do avanço no conhecimento molecular dos tumores desmóides, pouco se sabe sobre os parceiros de ligação ou genes alvo da β -catenina no microambiente dos tumores desmóides. Estudos de avaliação de mutação somática em larga escala se fazem necessários para preencher essa falta de conhecimento.

A identificação de novos parceiros de ligação ou genes alvo da β -catenina pode resultar no desenvolvimento de agentes terapêuticos que possam combater os tumores desmóides através de moléculas específicas, direcionando a ação o mais exclusivamente possível às células tumorais, reduzindo assim os efeitos colaterais do tratamento.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Definir um perfil de alterações somáticas em amostras de tumores desmóides esporádicos ou relacionados a síndromes genéticas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Construir bibliotecas para sequenciamento do exoma de amostras pareadas de cada paciente com DNA extraídos dos leucócitos e do tecido tumoral.
- Sequenciar as bibliotecas das amostras na plataforma de sequenciamento SOLiD (Applied Biosystems).
- Analisar e descrever as mutações somáticas identificadas nos tumores desmóides dos dois grupos, com e sem mutação germinativa no gene *APC*.
- Validar as mutações somáticas encontradas por sequenciamento do exoma nas mesmas amostras do estudo.

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital A.C.Camargo - Fundação Antônio Prudente, sob número 1547/11 (Anexo 1).

3.2 PACIENTES

Neste estudo retrospectivo, foram incluídos um total de 10 tumores desmóides confirmados histologicamente, que tenham sido submetidos ao tratamento cirúrgico no A.C.Camargo Cancer Center, SP. Foram incluídas amostras tumorais e de sangue periférico de todos os pacientes incluídos. Como as características clínicas da síndrome de polipose adenomatosa familiar (FAP) são muito bem estabelecidas, o principal critério para seleção dos pacientes com tumores desmóides familiares foram características clínicas, que são descritas no Quadro 1. Essas características foram analisadas pelo prontuário do paciente, bem como pelas características histopatológicas dos tumores encontrados. Entretanto, em paralelo, todos os tumores desmóides incluídos no projeto foram analisados por sequenciamento pelo método de Sanger para a mutação do gene *APC* e *CTNNB1*. Essa análise mutacional foi realizada com o intuito de reforçar o

diagnóstico e a separação dos tumores desmóides em esporádicos e familiares e foi realizada antes do sequenciamento do exoma. Pacientes que só tenham sido submetidos à biópsia foram excluídos desse estudo, uma vez que a quantidade de DNA não era suficiente para o sequenciamento do exoma.

Quadro 1 - Critérios para diagnóstico clínico da polipose adenomatosa familiar (FAP)

Critérios Clínicos
FAP é diagnosticada em um indivíduo portando uma das seguintes características: <ol style="list-style-type: none">1. Cem ou mais pólipos adenomatosos colorretal;2. Menos de 100 pólipos adenomatosos e um parente de primeiro grau com FAP;3. A detecção de uma mutação germinativa deletéria no gene <i>APC</i>.

3.3 DESENHO DO ESTUDO

Diagnóstico → Extração de DNA a partir de tecido fresco e sangue periférico dos 10 pacientes incluídos → Análise mutacional dos genes *APC* e *CTNNB1* através do método de sequenciamento por Sanger → Análise de alterações genômicas somáticas através do sequenciamento do exoma dos tecidos tumorais e sangue → Comparação das alterações adquiridas encontradas entre os subtipos tumorais incluídos → Validação das alterações encontradas.

3.4 EXTRAÇÃO DO DNA

O DNA genômico dos tecidos tumorais congelados e do sangue periférico foi isolado através da metodologia padrão de extração de DNA com fenol-clorofórmio, utilizando a proteinase K (BioAmerica Inc.). Resumidamente, após a digestão com a proteinase K, o DNA foi precipitado com fenol-clorofórmio (1:1), seguido pela segunda precipitação com acetato de sódio e etanol 100%.

A qualidade do DNA obtido foi avaliada através de gel de agarose. O DNA é considerado excelente quando somente uma banda é observada, ótimo quando se observa uma banda com um smear e bom quando se é observado somente um smear. A concentração do DNA foi analisada através do espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Scientific). Toda a parte de extração e análise da qualidade do DNA foi feita no Laboratório de macromoléculas/biobanco do A.C. Camargo Cancer Center.

3.5 SEQUENCIAMENTO DOS GENES APC E CTNNB1 PELO MÉTODO DE SANGER

Para o sequenciamento dos genes *APC* e *CTNNB1*, utilizamos os *primers* fornecidos pelo Laboratório de Genômica e Biologia Molecular do A.C. Camargo Cancer Center e que já foram utilizados em outros estudos do grupo (TORREZAN et al. 2012, 2013; Anexo 2). Os primers foram desenhados a partir da sequência gênica do DNA genômico, disponibilizado

pelo National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), dos genes *APC* (NM_000038) e *CTNNB1* (NM_001098209).

3.5.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para a reação de PCR foram utilizados 25 μ L da enzima GoTaq® Green Master Mix, 2X (Promega), 2.5 μ L de primer senso e 2.5 μ L de primer antisenso para se obter uma concentração final de 0.5 μ M, 5 μ L de DNA (10 ng/ μ L), e água para completar a um volume final de 50 μ L. As seguintes condições foram utilizadas para as reações de amplificação do gene *CTNNB1*: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento dos iniciadores a 60°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos. Para a amplificação do gene *APC*, as seguintes condições foram utilizadas: desnaturação inicial a 95°C por 6 minutos, seguido por 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 45 segundos, anelamento dos iniciadores a 56°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto.

Todos os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% e corados com SYBR® Safe (Life Technologies). Os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados através da luz ultravioleta e fotografados utilizando um equipamento de fotodocumentação Geldoc (BioRad). Após a confirmação da amplificação dos amplicons desejados, os produtos foram armazenados a -20°C até o seu uso.

3.5.2 Purificação dos produtos de PCR e reação de sequenciamento

Para eliminar qualquer substância que pudesse inibir a reação de sequenciamento, os produtos de PCR foram purificados através da utilização da exonuclease I (EXO) e fosfatase alcalina (SAP) (ExoSAP-IT, Affymetrix). Os produtos de PCR foram misturados com tampão de diluição e água em um volume final de 7 μ L. A reação enzimática foi incubada em um termociclador por 30 minutos a 37°C, seguida da inativação das enzimas a 80°C por 15 minutos, conforme protocolo recomendado pelo fabricante. Seguida da purificação, os produtos de PCR foram sequenciados utilizando o kit BigDye Terminator Cycle Sequencing Standard (*Applied Biosystems*).

Inicialmente, as soluções contendo o DNA, os iniciadores (senso ou antisenso a 5 μ M) e água foram distribuídos em placas de 96 poços, totalizando um volume de 10 μ L por poço. A cada poço foi adicionado 1 μ L da solução de Big Dye contendo ddNTPs (dNTPs marcados com corantes fluorescentes que vão ser incorporados às fitas de DNA e poderão ser lidos pelo sequenciador) e 1,5 μ L do tampão de sequenciamento 5X. A reação do sequenciamento foi realizada no termociclador Applied Biosystems (Applied Biosystems) nas seguintes condições: uma desnaturação inicial a 95°C por 1 minuto e 30 segundos, seguida por ciclagens a 95°C por 18 segundos, 52°C por 18 segundos e 60°C por 4 minutos, com 40 repetições desse ciclo.

Posteriormente, 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 e 25 μ L de ETOH 100%. A reação foi, então, deixada no escuro por 15 minutos. Em seguida, a reação foi centrifugada a 4.000 rpm por 30 minutos a

4°C. Após descartar o sobrenadante, a reação foi lavada com 35 µL de ETOH 70% e centrifugada a 4.000 rpm por 30 minutos a 4°C. As amostras foram ressuspensas em 15 µL de formamida Hi-Di (Life Technologies) e a reação passou por uma desnaturação a 95°C por 3 minutos. A reação foi mantida no gelo até ser sequenciada no sequenciador automático ABI 3130xl (Life Technologies). As sequências foram analisadas através do programa CLCbio *Main Workbench* (CLC Bio Inc.).

3.6 SEQUENCIAMENTO DO EXOMA

As análises das alterações genômicas foram realizadas por sequenciamento paralelo maciço das regiões genômicas correspondentes ao exoma no laboratório de genômica e biologia molecular.

O DNA genômico (1µg) extraído e purificado foi utilizado para a construção de uma biblioteca utilizando o SOLiD™ *Fragment Library Barcoding Kit* (Applied Biosystems). O enriquecimento da região correspondente ao exoma foi feita com o kit de captura direcionado para todo o exoma humano *SureSelect Human All Exon V4 kit 50Mb Kit* (Agilent Technologies), seguindo o protocolo do fabricante. Neste processo, todos os éxons humanos são capturados (1.22% do genoma, correspondentes às regiões codificadoras). Após fragmentação, seleção de tamanho e ligação de adaptadores específicos para o sequenciamento, o DNA genômico foi ligado a adaptadores específicos e hibridizado com sondas de RNA contendo biotina, correspondentes à região do exoma (50Mb). Os fragmentos de DNA

hibridizados com as sondas foram então capturados com a utilização de partículas magnéticas de estreptavidina, de acordo com as especificações do fabricante (**Figura 7**). Após a captura, as moléculas de DNA alvo são liberadas através da digestão da sonda de RNA, para então serem amplificadas através de PCR em emulsão. Seguida ao preparo das bibliotecas, as amostras enriquecidas foram sequenciadas utilizando a plataforma SOLiD™ 4 System (Life Technologies). A tecnologia utilizada pelo sequenciamento do SOLiD inclui uma amplificação em emulsão do DNA ligado a esferas. Após a amplificação e enriquecimento, as sondas contendo os fragmentos de DNA modificados na extremidade 3' são depositadas em uma lâmina de vidro. O sequenciamento se dá por seguidas etapas de hibridização e ligação. Os *primers* se hibridizam com a sequência do adaptador P1 das sondas contendo os fragmentos de DNA e, então, um conjunto de 4 diferentes sondas marcadas com fluoróforos competem para se ligar ao *primer* de sequenciamento.

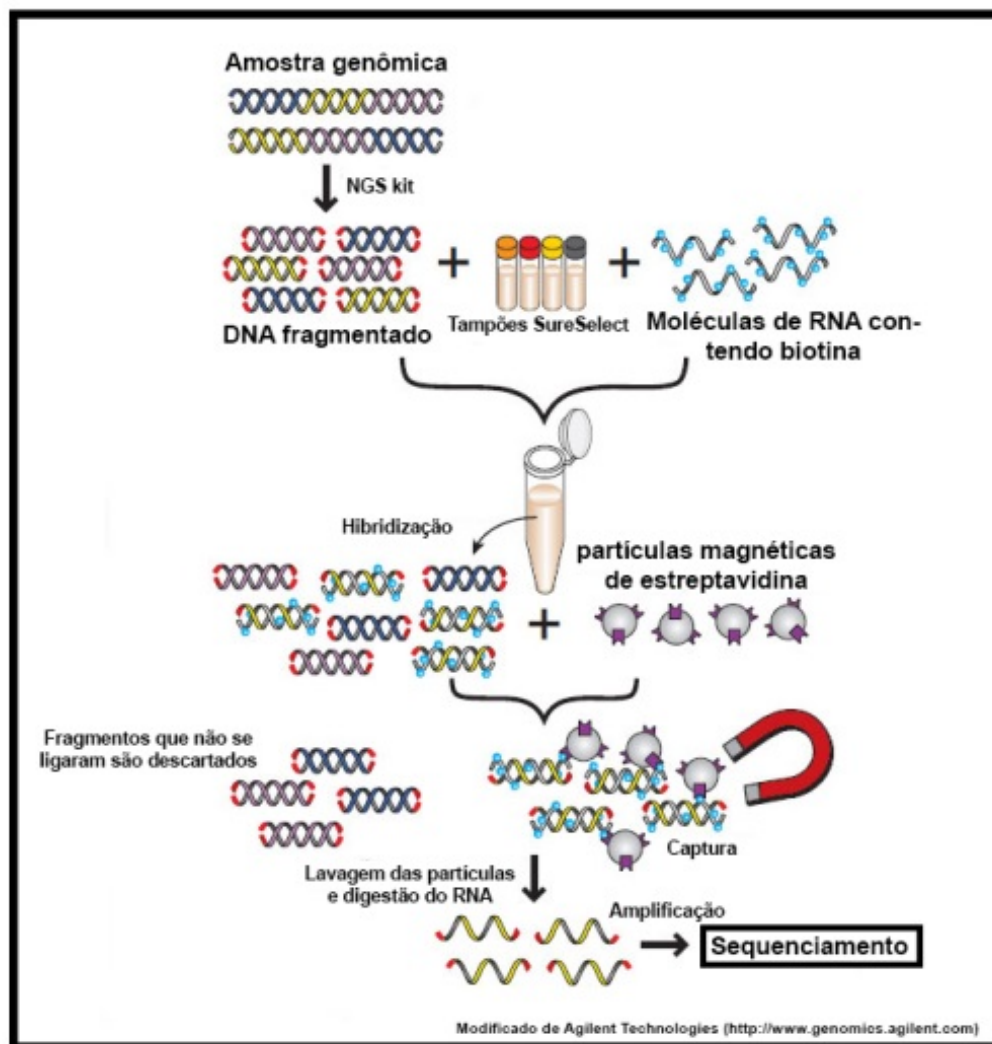


Figura 7 - Sistema de enriquecimento de região alvo. Esquema mostrando a metodologia do SureSelect, que utiliza longas moléculas de RNA biotiniladas que capturam regiões de interesse a partir de amostras de DNA fragmentado, enriquecendo essas regiões.

A ligação destes fragmentos, feita através da ação de uma ligase, resulta na liberação do fluoróforo presente na sonda. Cada uma das quatro sondas possui um fluoróforo diferente, portanto, cada um é detectado com uma cor diferente. Essa fluorescência depende do par de base inicial presente em cada sonda, o que permite a interrogação das duas primeiras bases nas quais ele se hibridiza. Após a hibridização e detecção, as três bases finais da sonda são clivadas, permitindo assim que todo o ciclo de ligação, detecção e clivagem ocorra múltiplas vezes. Após uma série de ciclos de ligação, detecção e clivagem, o produto de extensão é removido e o molde é repostado com um *primer* complementar para a posição n-1 para uma segunda rodada de ciclos de ligação. No total, cinco ciclos de *primers* são realizados para cada fragmento de DNA molde. Dessa forma, cada base é interrogada em duas reações de ligação independentes realizadas por dois *primers* diferentes, o que resulta em uma leitura precisa (99,9%) de cada base (**Figura 8**).

3.7 ANÁLISE DO SEQUENCIAMENTO DO EXOMA

As sequências geradas no SOLiD foram alinhadas através do programa *Bioscope* (Life Technologies) a um genoma humano de referência (UCSC hg19) e a um arquivo .BAD gerado pela empresa Agilent contendo todas as coordenadas genômicas das regiões alvos do kit *SureSelect Human All Exon 50Mb Kit*. O programa *Bioscope* (Applied Biosystems) já apresenta parâmetros definidos para mapeamento de sequências curtas

geradas pelo equipamento SOLiD e realiza o mapeamento na sequência genômica em *color-base* (**Figura 9**).

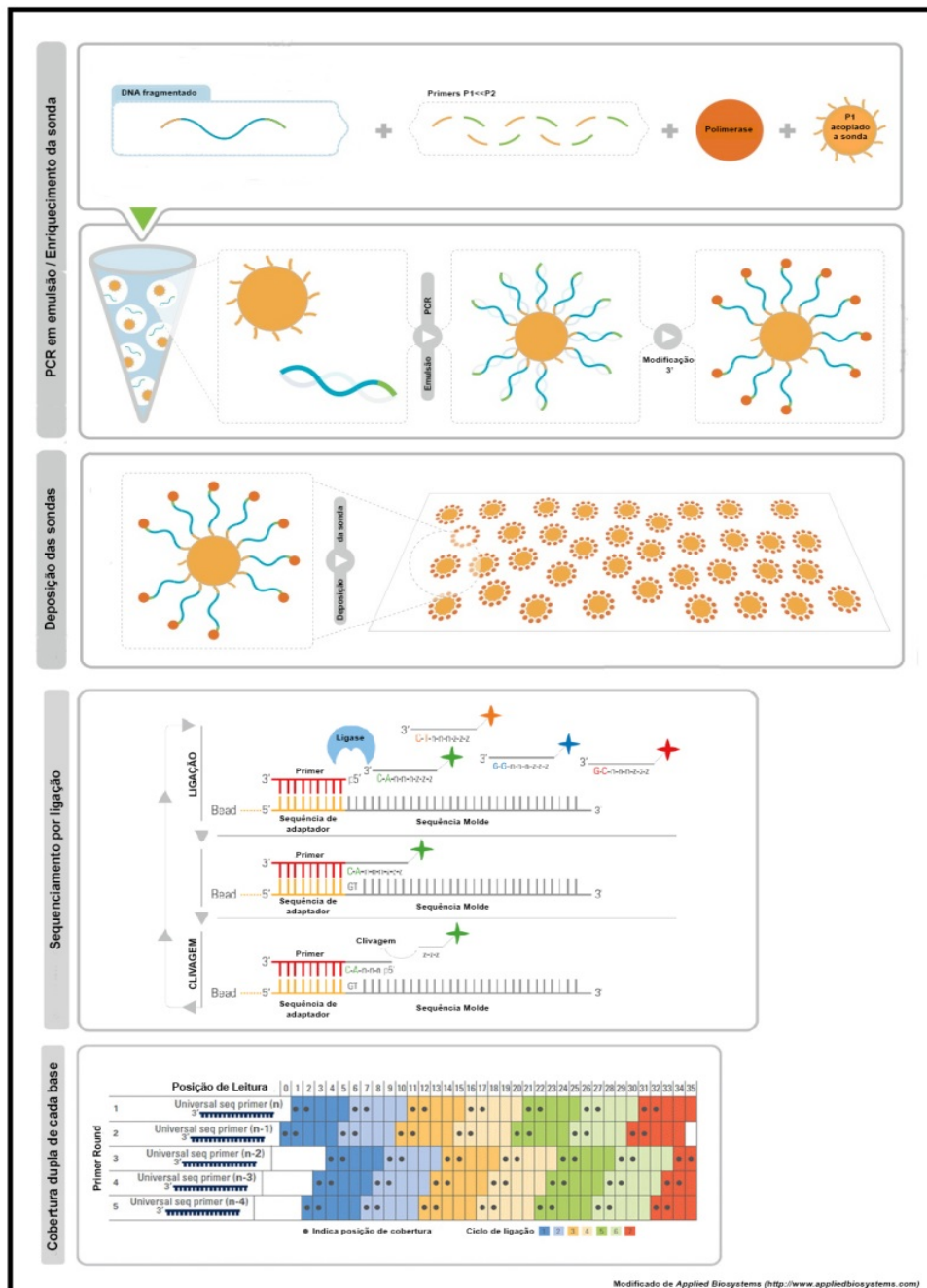


Figura 8 - Sequenciamento SOLiD™. Esquema mostrando uma visão global de como ocorre o sequenciamento em larga escala da plataforma SOLiD™.

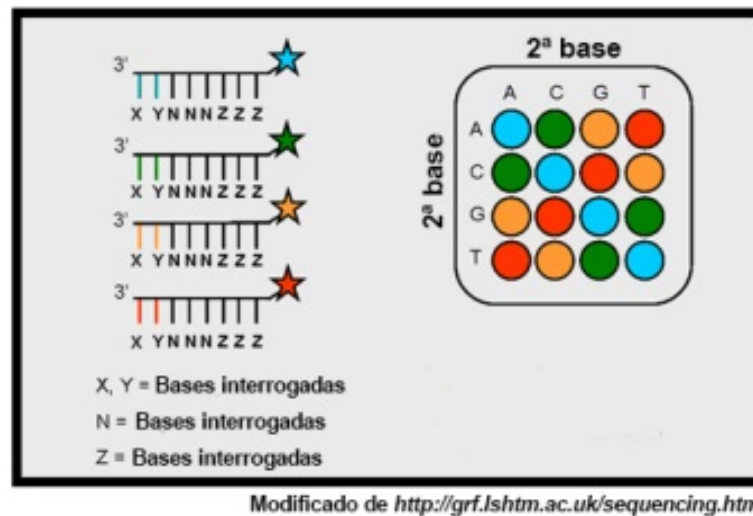


Figura 8 - Color-code. Figura mostrando em qual cor resulta cada combinação de par de base.

Após o mapeamento, foi realizada a detecção de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) e pequenas deleções e inserções. Para a chamada de SNPs foi utilizado o programa *Bioscope* versão 1.3, uma vez que este programa possui ferramentas para a detecção de tipos específicos de alterações, como os SNPs e CNVs (variações no número de cópias). Para a chamada INDELS foi utilizado o programa *SHRiMP*, que durante seu fluxo de trabalho alinha as sequências genômicas contra um genoma alvo.

Uma vez feita a chamada dos SNPs e indels, todas as alterações encontradas foram comparadas com dois bancos de dados de SNPs: o dbSNP (versão 131), que possui dados de 1.094 indivíduos, e o banco de SNP do projeto 1000 Genomes. Dessa forma, só foram utilizadas para validação alterações que não sejam SNPs previamente conhecidos. Além disso, a sequência obtida através do DNA tumoral de cada paciente foi comparada com a sequência germinativa obtida através do DNA de

leucócitos do mesmo paciente. Assim, foram excluídas da validação as alterações germinativas de cada paciente e que provavelmente não estão relacionadas com a tumorigênese da fibromatose. Por fim, as alterações específicas dos tumores desmóides foram identificadas utilizando outros programas disponíveis na literatura, como o *MutationTaster* e outros mais recentes. Foram consideradas para a validação somente as alterações que levassem à alteração de base, com troca de aminoácido e inserção ou deleção, que resultasse em uma alteração do código de leitura.

Todas as análises desse trabalho foram feitas em colaboração com o grupo do Dr. Pedro A.F. Galante, no Instituto Sírio-Libanês de Ensino e Pesquisa do Hospital Sírio-Libanês. Além disso, em paralelo esses dados também foram analisados pelo grupo de bioinformática do A.C. Camargo Cancer Center.

Só foram selecionadas para validação posterior as sequências com os seguintes critérios: a) uma cobertura mínima de 10 *reads*, b) frequência da variante em no mínimo 10% das sequências. Com intuito de validar essas alterações, todas as mutações encontradas com o sequenciamento no SOLiD foram analisadas por sequenciamento pelo método de Sanger e Ion AmpliSeq.

3.8 VALIDAÇÃO POR SEQUENCIAMENTO AUTOMÁTICO DIRETO (MÉTODO SANGER)

Para se ter um melhor entendimento e certeza que o sequenciamento automático Sanger seria sensível suficiente para detectar as mutações encontradas pelo sequenciamento em larga escala, inicialmente apenas 5 alterações foram selecionadas para serem validadas utilizando esse método.

Para o sequenciamento por Sanger, foi realizada uma reação de PCR utilizando o DNA genômico extraído das amostras tumorais. Para os cinco genes de interesse para validação, *CTNNB1*, *HSPD1*, *MTCH2*, *CADPS* e *ADAR*, foram desenhados primers a partir da sequência gênica (*CTNNB1*: NM_001098209, *HSPD1*: NM_002156, *MTCH2*: NM_014342, *CADPS*: NM_003716, e *ADAR*: NM_001025107) do DNA genômico disponibilizado pelo NCBI para que amplificassem fragmentos de aproximadamente 300 pb.

Quadro 2 - Primers desenhados para validação do sequenciamento do exoma

Gene	Primer senso (5'-3')	Primer anti-senso (5'-3')
<i>CTNNB1</i>	CAATCTACTAATGCTAATACTGTTTCG	TCTGACTTTTCAGTAAGGCAATG
<i>HSPD1</i>	CCACGGGTGGTAGTTCTGAT	TGAGTTCTCTCAAAAATGGAGATG
<i>MTCH2</i>	ACATTGCCAGTATCGATGGG	GCAACATCTATGGGAAGATTGATTT
<i>CADPS</i>	AATGGACAGTTTCCTCCTGCT	TCCTCTGGTAGATTTACAGTTTTGG
<i>ADAR</i>	TGGGACTCCGAAGAAAGAAA	CGGCCATGTCTAAAACTCAA

Para a reação de PCR foram utilizados 25 µL da enzima GoTaq® Green Master Mix, 2X (Promega), 2.5 µL de primer senso e 2.5 µL de primer antisenso para se obter uma concentração final de 0.5 µM, 5 µL de DNA (10

ng/ μ L) e água para completar a um volume final de 50 μ L. As seguintes condições foram utilizadas para as reações de PCR: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento dos iniciadores a 60°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos. Posteriormente, os produtos foram purificados através enzima Exo-SAP-IT (Affymetrix) e sequenciados utilizando o kit BigDye Terminator Cycle Sequencing Standard (Applied Biosystems) e o sequenciador automático ABI PRISM 3130XL (Life Technologies), seguindo o mesmo do item 3.5.2. As sequências foram analisadas através do programa CLCbio *Main Workbench* (CLC Bio Inc.).

3.9 VALIDAÇÃO POR TARGET SEQUENCING USANDO ION AMPLISEQ™ E A PLATAFORMA ION PGM

Para a validação do sequenciamento do exoma, confeccionamos um painel de 170.27kb, com variação de tamanho de *amplicon* de 125-275pb. Esse painel foi confeccionado para genes completos e consistia em 1.066 *amplicons*, divididos em 2 *pools*. Os genes selecionados para a confecção desse painel foram: *APC*, *CTNNB1*, *MTCH2*, *ADAR*, *HSPD1*, *ITGB1*, *DPP6*, *ADAMTS9*, *MST1P2*, *CADPS*, *RAGE*, *MLL4*, *PPP1R15A*, *HRC*, *MTF1*, *ARHGAP32*, *OR8I2*, *CNTN6*, *MAST1*, *PRAMEF2*, *RAB6B*, *SI*, *DCAF4L1*, *ANKRD17*, *METAP1*, *TTC37*, *ABCC2*, *CHEK1*, *SLCO1C1*, *SMAD9*, *TPP2*, *PNN*, *MDGA2*, *CENPT*, *DRG2*, *NLRP12*, *LARGE*.

Utilizamos os painéis Ion AmpliSeq™ para construção da biblioteca utilizando 10ng de DNA de cada paciente, de acordo com as instruções do fabricante (*Life Technologies*). Resumidamente, os genes alvos foram amplificados utilizando os tubos de primers multiplexados pré-agrupados na concentração pronta para uso. Após a amplificação, os produtos amplificados foram tratados com 2 µl do reagente *Fupa* para digerir parcialmente os *primers* e fosforilar os produtos de amplificação. Os produtos de amplificação foram, então, ligados aos adaptadores com *barcodes* e purificados (**Figura 10**).

Após, as bibliotecas foram transferidas para o Sistema Ion OneTouch™ para a preparação do *template*. O sequenciamento foi, então, realizado no sequenciador Ion PGM™. A análise dos dados foi realizada com Ion Reporter™ Software. Em conjunto, todas as sequências foram também analisadas no programa *CLC Main Workbench* (*CLCbio*), com o intuito de descartar falsos-positivos.

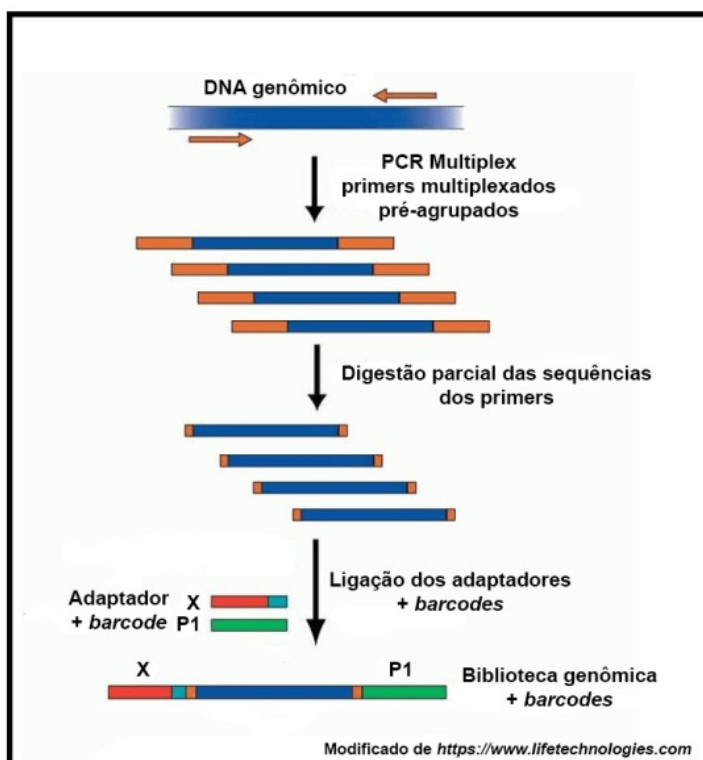


Figura 9 - Preparo de biblioteca para Ion AmpliSeq™. Esquema mostrando as principais etapas envolvidas no preparo das bibliotecas do Ion AmpliSeq™.

3.10 DESCRIÇÃO DAS MUTAÇÕES ENCONTRADAS

Conforme recomendado pela Human Genome Variation Society (www.hgvs.org/mutnomen), a nomenclatura utilizada para as mutações encontradas foi baseada em Den Dunnen e Antonarakis (DEN DUNNEN e ANTONARAKIS 2000).

3.11 SIGNIFICÂNCIA PATOGENICA DAS MUTAÇÕES ENCONTRADAS

A interpretação e determinação da significância patogênica das mutações foi investigada por 3 diferentes algoritmos. Com o objetivo de prever a patogenicidade das alterações de significado clínico desconhecido, utilizamos os algoritmos POLYPHEN-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>), SIFT (http://sift.jcvi.org/www/SIFT_BLink_submit.html) e mutation taster (<http://www.mutationtaster.org/>).

4 RESULTADOS

Nesse estudo foram incluídos 10 pacientes não relacionados. Destes, 3 (30%) preenchem critério para síndrome polipose adenomatosa familiar (FAP). Todos os 7 (70%) pacientes restantes foram considerados como portadores de tumores desmóides esporádicos.

4.1 EXTRAÇÃO DO DNA

O DNA de todos os tumores desmóides, bem como seus respectivos tecidos normais (sangue), foram extraídos e avaliados em gel de agarose (0.8%) para verificar sua integridade. Para a maioria das amostras o DNA extraído foi considerado de qualidade ótima, como pode ser observado na Figura 11. Todas as amostras apresentaram DNA com as taxas 260/280 e 260/230 acima de 2.0.

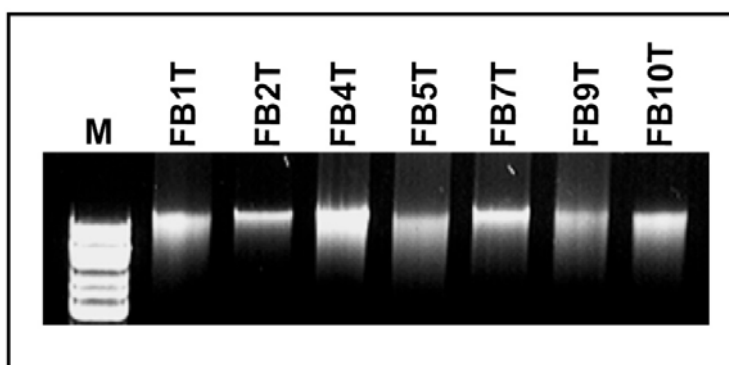


Figura 10 – Gel de agarose. Gel mostrando exemplos de DNA de amostras de tumores desmóides extraídos.

4.2 SEQUENCIAMENTO DOS GENES APC E CTNNB1 PELO MÉTODO DE SANGER

Todas as reações de PCR foram padronizadas utilizando DNA genômico extraído de leucócito dos pacientes incluídos nesse estudo. Foram consideradas reações padronizadas aquelas que apresentaram no gel de agarose fragmentos únicos do tamanho esperado, como exemplificado na Figura 12.

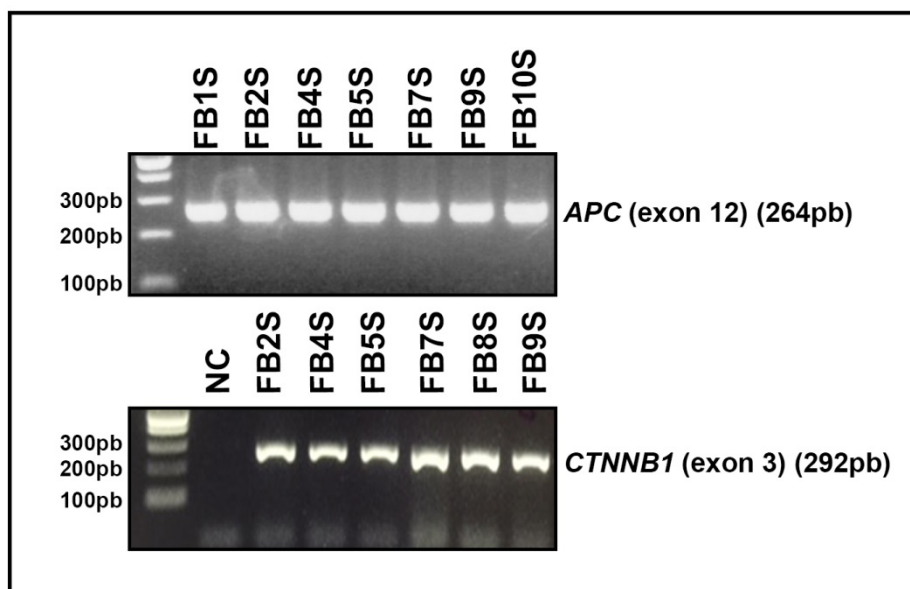


Figura 11 - Gel de agarose 2% da reação de PCR. PCR padronizado com fragmentos apresentando banda única de ~300 pb.

O sequenciamento automático por Sanger foi realizado em todas as 20 amostras incluídas nesse estudo (10 tumores desmóides + 10 leucócitos respectivos de cada tumor) com o intuito de rastrear as mutações germinativas em *APC* e as mutações somáticas em *CTNNB1*. Todos os

exons do gene *APC* foram rastreados. Já para o gene *CTNNB1*, só o exon 3 foi rastreado, uma vez que todas as mutações relatadas nos tumores desmóides se encontram nesse exon.

As análises dos 10 pacientes rastreados para estes genes identificaram 3 (30%) mutações germinativas no gene *APC* e 4 (40%) mutações somáticas no gene *CTNNB1*. Não foi encontrada nenhuma mutação em 3 (30%) amostras.

A mutação germinativa do gene *APC* foi encontrada em todos (100%) os pacientes que preenchem os critérios da síndrome FAP (Tabela 1). Das mutações encontradas nos pacientes FAP, 2 (66.7%) delas eram deleção e 1 (33.3%) era mutação pontual do tipo missense, todas elas levando a um códon de parada prematuro. Em relação à localização da mutação, as amostras FB1 e FB8 (2/3; 66.7%) apresentaram a mutação no éxon 15, já na amostra FB7 (1/3; 33.3%) a mutação foi encontrada no exon 12 do gene *APC*.

Dentre os pacientes com tumores desmóides esporádicos, a mutação no éxon 3 do gene *CTNNB1* foi encontrada em 4 (57.1%) amostras. Não foi detectada nenhuma mutação de *CTNNB1* em 3 (42.9%) pacientes com tumores desmóides esporádicos (Tabela 2). Das mutações encontradas, todas (100%) foram mutações pontuais do tipo missense. Dentre os pacientes mutados, a maioria (2/4; 50%) apresentou a mutação c.121A>G (p.T41A). Um (25%) paciente apresentou a mutação c.134C>T (p.S45F) e um paciente (25%) apresentou a mutação c.133T>C (p.S45P).

Tabela 1 - Dados mutacionais do gene *APC* nos tumores desmóides incluídos nesse estudo

Amostra	Status Mutacional
FB1T	c.4393_4394delAG p.Ser1465Trpfs*3
FB7T	c.1370C>G p.Ser457*
FB8T	c.3049_3052delAATG p.Asn1017Metfs*4

Tabela 2 - Dados mutacionais do gene *CTNNB1* nos tumores desmóides incluídos nesse estudo

Amostra	Status Mutacional
FB2T	c.134C>T p.S45F
FB3T	Nenhuma mutação encontrada
FB4T	c.121A>G p.T41A
FB5T	Nenhuma mutação encontrada
FB6T	c.133T>C p.S45P
FB9T	c.121A>G p.T41A
FB10T	Nenhuma mutação encontrada

Portanto, para o sequenciamento do exoma, foram incluídas 3 pacientes com tumores desmóides associados à FAP, todos com mutação germinativa para o gene *APC*, e 7 pacientes com tumores desmóides esporádicos, sendo 4 deles mutados para o gene *CTNNB1* e 3 deles selvagens tanto para *CTNNB1* quanto para *APC*. Uma vez que as mutações dos genes *CTNNB1* e *APC* foram analisadas tanto no sangue quanto nos tecidos tumorais, pudemos confirmar a presença da mutação no gene *APC*

tanto no sangue como no tecido tumoral dos pacientes associados à FAP. Já nos pacientes com tumores desmóides esporádicos as mutações no gene *CTNNB1*, foram encontradas somente nos tecidos tumorais.

4.3 CONFECÇÃO DAS BIBLIOTECAS

Para a construção das bibliotecas, todas as amostras foram quantificadas no aparelho Qubit® (Invitrogen™), segundo recomendações do fabricante, uma vez que a quantificação neste aparelho é altamente sensível e baseada na quantidade de fluorescência emitida.

Para este sequenciamento, foram construídas 20 bibliotecas, utilizando o *SOLiD™ Fragment Library Barcoding Kit* (Applied Biosystems) e o *SureSelect Human All Exon 50Mb Kit* (Agilent). Para cada paciente, foram realizadas duas bibliotecas com DNAs extraídos do tecido tumoral e do seu respectivo leucócito, classificados como tumor e normal, respectivamente. Em cada *full slide* (lâmina de sequenciamento da plataforma SOLiD) foi incluído um *pool* com 10 bibliotecas (tumor e normal) provenientes de 5 pacientes .

Após a fragmentação do DNA, espera-se que os fragmentos estejam dentro do tamanho recomendado (entre 100 e 200 pb). Para checar se a fragmentação do DNA ocorreu de forma correta, foi realizada uma etapa de checagem no *Bioanalyzer* (Agilent) para verificação do tamanho dos mesmos. A Figura 13 está mostrando a fragmentação das 10 bibliotecas incluídas no *pool* de bibliotecas 2.

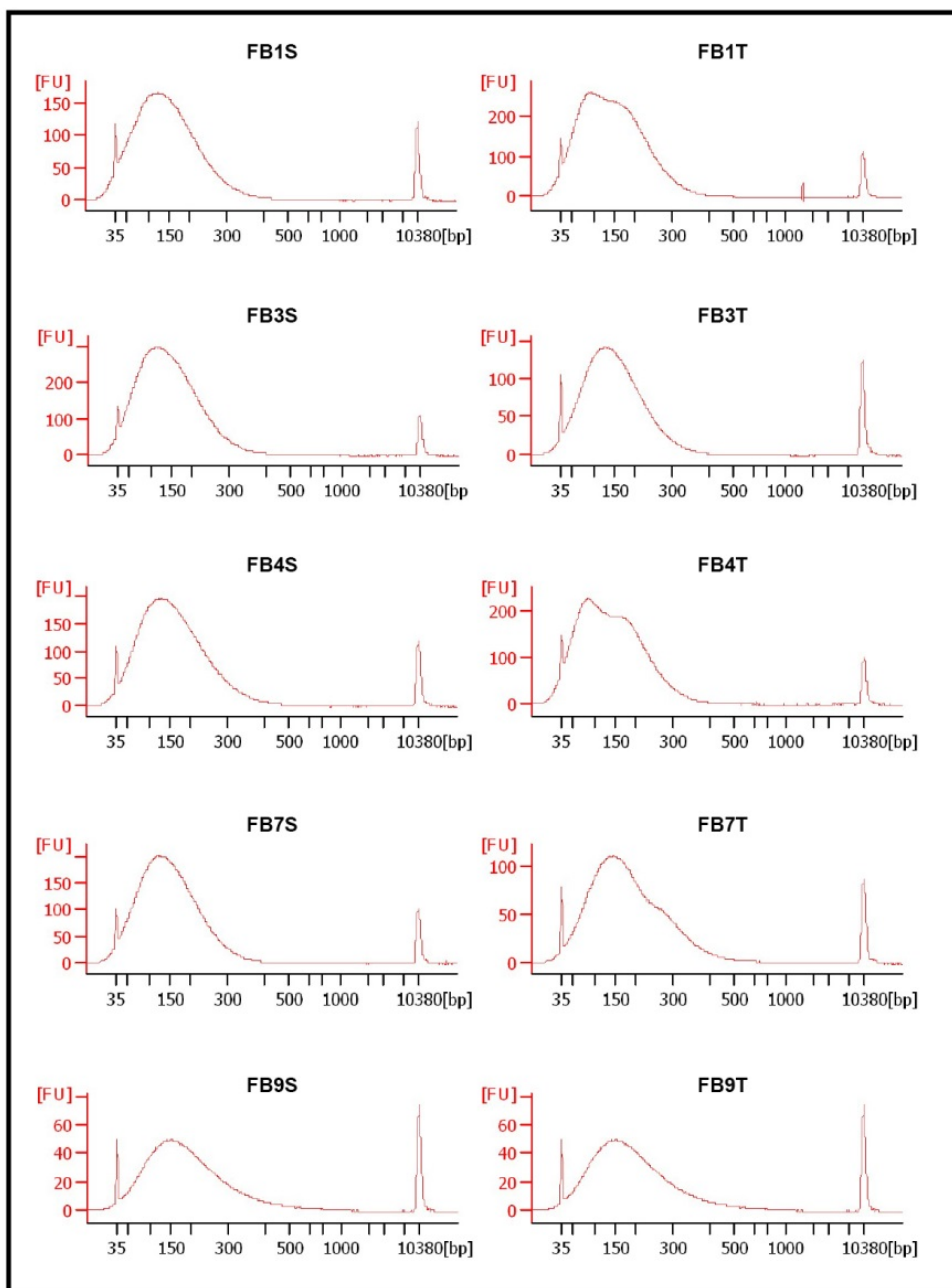


Figura 12 - Análise fragmentação do DNA (*pool* de bibliotecas 2). O eletroferograma mostra que a fragmentação ocorreu de forma satisfatória com os fragmentos com tamanho em torno de aproximadamente 150 pb.

Logo após a amplificação dos fragmentos e a purificação, todas as bibliotecas foram corridas em um chip de DNA High Sensitivity no Bioanalyzer (Agilent), para checar se as mesmas foram amplificadas da forma como o fabricante recomenda. A Figura 14 apresenta a análise de 10 bibliotecas incluídas no *pool* de bibliotecas 2.

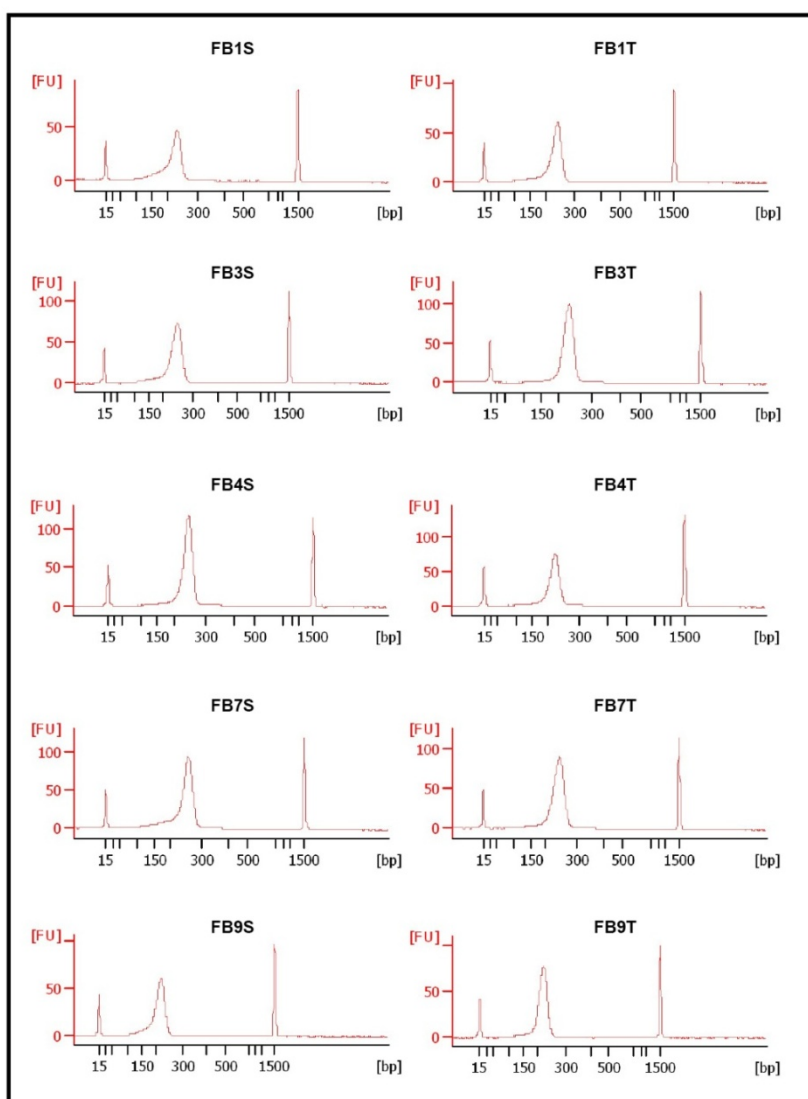


Figura 13 - Análise das bibliotecas de DNA amplificadas (*pool* de bibliotecas 2). O eletroferograma mostra um único pico no tamanho esperado de aproximadamente 250 pb.

Após a etapa de amplificação, foi feita a captura do DNA e a digestão da sonda de RNA, seguida de nova purificação. Na sequência, todas as 20 bibliotecas confeccionadas foram novamente corridas em um chip de DNA High Sensitivity (Agilent), como pode ser observado na Figura 15.

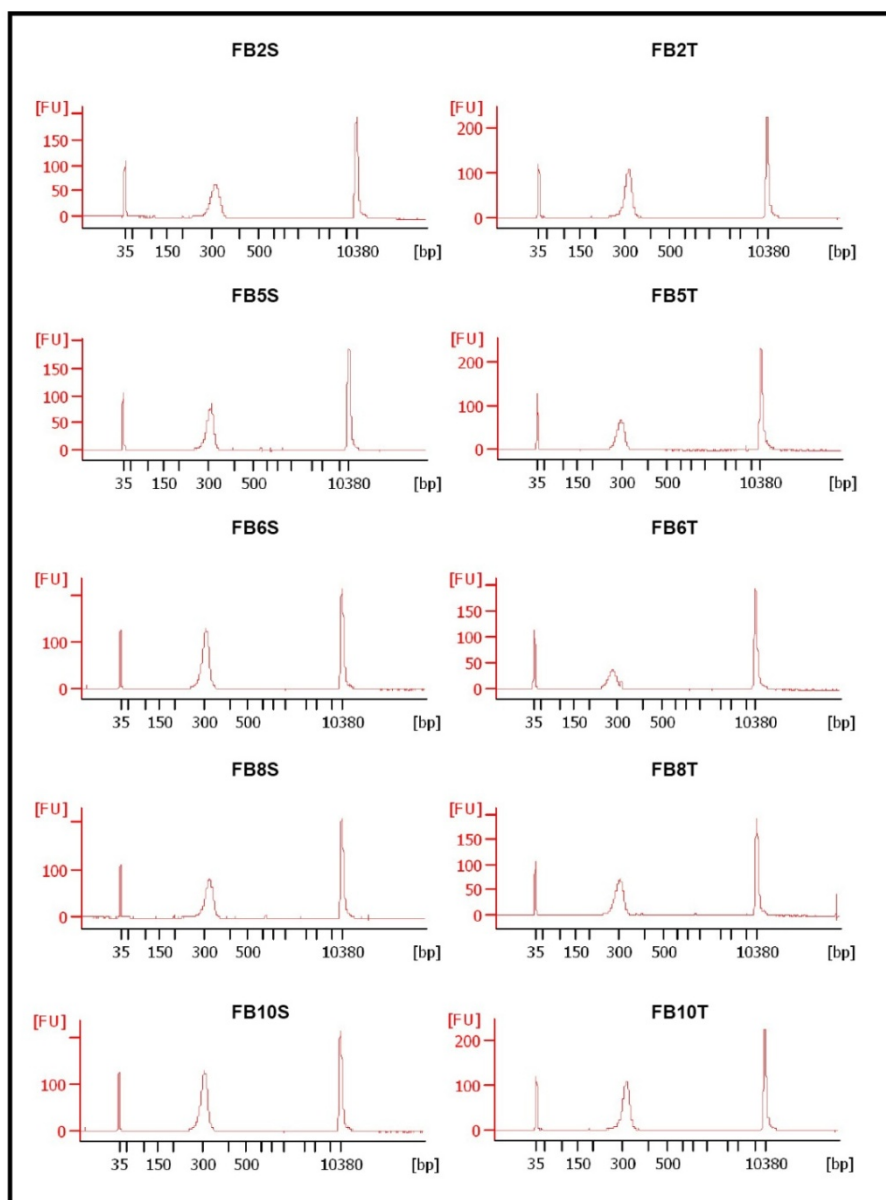


Figura 14 - Análise de 10 bibliotecas pós-captura (*pool* de bibliotecas 1). O eletroferograma mostra um pico no intervalo dos tamanhos 270-350 pb, o que é o tamanho desejado de acordo com o estabelecido pelo fabricante.

Após a construção, as bibliotecas foram amplificadas através de PCR em emulsão. Após a PCR em emulsão e o enriquecimento, mais um ponto de checagem foi feito antes das bibliotecas serem sequenciadas, com o objetivo de avaliar a qualidade da PCR em emulsão e do enriquecimento. Esse ponto de checagem é conhecido como *workflow analysis* (WFA) e é exigido pelo fabricante (*Applied Biosystems*). A PCR em emulsão e o enriquecimento dos *pools* de bibliotecas (*pools* biblioteca 1.1 e 1.2 e *pools* biblioteca 2.1 e 2.2) para serem sequenciados em cada *full slide* estavam de acordo com os padrões estabelecidos. Como pode ser observado na Figura 16, foram testadas duas condições de quantidade de DNA para cada *pool* de biblioteca. Foram escolhidos os *pools* 1_2 e 2_1 por apresentarem o maior número de reads nos parâmetros recomendados.

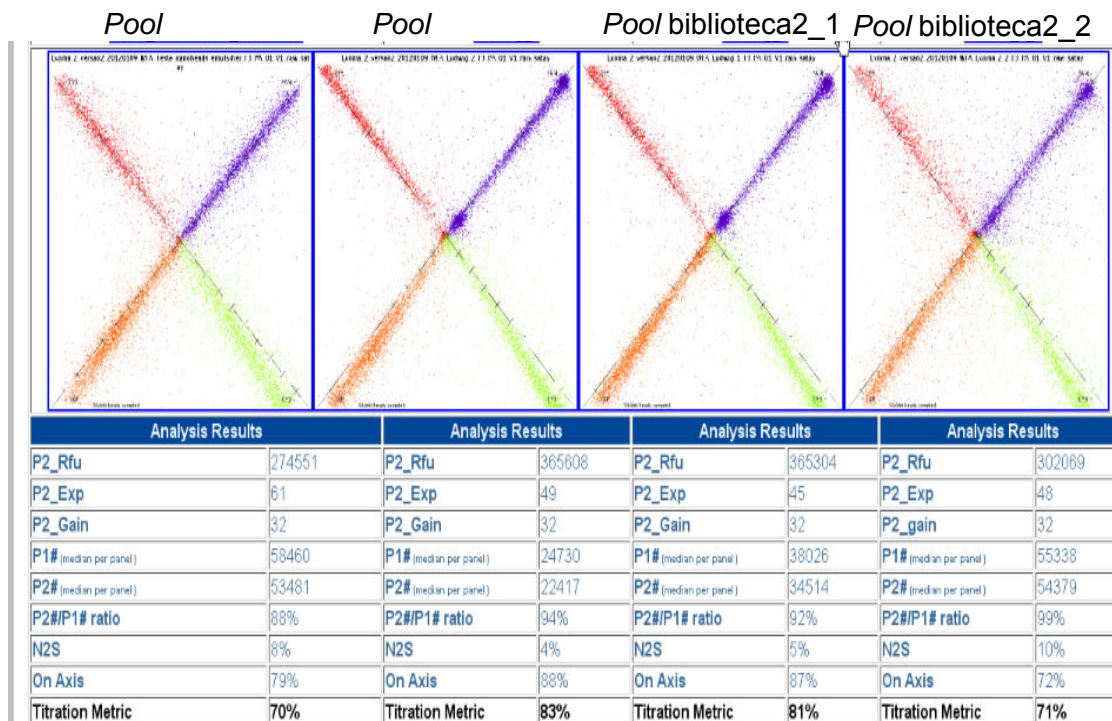


Figura 15 - Resultado da WFA do *pool* de bibliotecas 1 e 2. Análise de WFA mostrando que a biblioteca se mostrou adequada de acordo com o recomendado pelo fabricante.

O sequenciamento do exoma de todas as amostras incluídas neste projeto foi realizado utilizando o *SOLiD™ 4 System*. Para os 2 *pools* de bibliotecas construídos, foram utilizados 2 *full slides*. Um *pool* de biblioteca foi adicionado a cada *full slide*. Na Figura 17 pode ser observada a densidade de deposição das sondas na lâmina de sequenciamento.

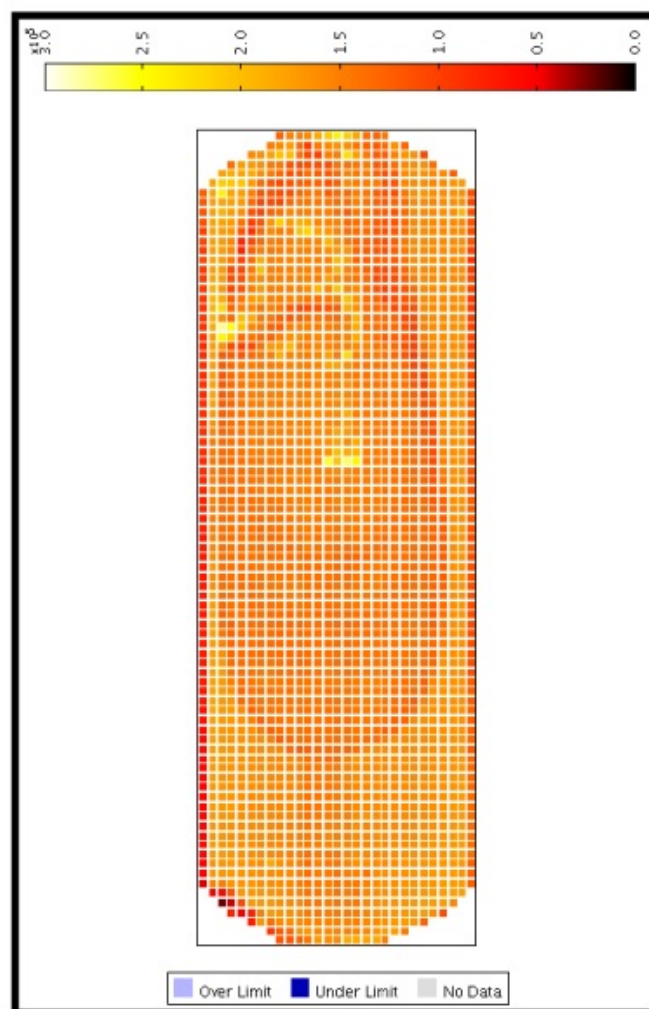


Figura 17 - Deposição das sondas na lâmina de sequenciamento. A densidade de deposição em cada região da lâmina está representada por uma escala de cor onde as regiões em amarelo e laranja apresentam alta densidade.

4.4 ANÁLISE DO SEQUENCIAMENTO DO EXOMA

A análise do sequenciamento do exoma foi feita em colaboração com o pesquisador Dr. Pedro A. F. Galante, do Laboratório de Bioinformática do Instituto Sírio-Libanês de Ensino e Pesquisa. Além disso, em paralelo as análises também foram feitas pelo grupo de bioinformática do A.C. Camargo Cancer Center.

Os resultados do sequenciamento dos exomas de 7 pacientes com tumores desmóides esporádicos e 3 pacientes com tumores desmóides associados à FAP foram obtidos. Os resultados das alterações genéticas geradas através do sequenciamento pelo *SOLiD* foram filtrados e os dados gerados de todas as amostras foram submetidos à análise de bioinformática.

No grupo dos tumores desmóides esporádicos, em média, 109.856.191 reads foram geradas para cada paciente, das quais aproximadamente 66% foram mapeadas nas regiões de interesse. A média de cobertura obtida para as regiões alvos foi de 88%. Pelo menos, 75% das regiões alvos capturadas foram cobertas por 10 ou mais reads para todas as amostras de tumores desmóides esporádicos, o que está de acordo com a literatura. Já no grupo dos tumores desmóides associados à FAP, em média, foram geradas 133.876.756 reads para cada paciente, dos quais aproximadamente 68% foram mapeadas nas regiões de interesse. A média de cobertura obtida para as regiões alvos foi de 92% (Tabela 3). Pelo menos, 77% das regiões alvos capturadas foram cobertas por 10 ou mais reads para todas as amostras de tumores desmóides associados à FAP. No casos dos tumores desmóides associados à FAP, além das mutações somáticas, também analisamos as mutações germinativas do gene *APC*, por se tratar de uma síndrome familiar associada à mutação nesse gene.

Tabela 3 - Dados gerados pelo sequenciamento do exoma dos tumores desmóides utilizando a plataforma SOLiD
S - Sangue (amostra normal); T – Tumor (tecido tumoral)

Amostra	Total de Fragmentos	Reads on targets	% Reads on targets	% Reads off targets	% Targets coverage >10x	% Targets coverage >20x	% Targets coverage >100x	Cobertura média
tumores desmóides esporádicos								
FB2S	72.101.860	45.113.562	62.57	37.43	55.44	44.90	6.93	31.29
FB2T	123.695.002	83.123.799	67.20	32.80	77.70	67.60	16.47	57.70
FB3S	113.023.660	69.341.965	61.35	38.65	76.67	63.45	11.72	48.23
FB3T	101.349.966	67.275.686	66.38	33.62	58.37	51.13	14.52	46.78
FB4S	93.019.567	57.312.137	61.61	38.39	73.36	58.50	8.10	39.81
FB4T	106.475.132	70.282.789	66.01	33.99	75.51	63.77	12.31	48.95
FB5S	133.682.090	88.920.386	66.52	33.48	81.73	71.19	18.62	63.61
FB5T	151.435.930	105.626.951	69.75	30.25	81.67	73.64	25.79	75.60
FB6S	94.647.536	62.349.027	65.87	34.13	76.95	61.66	9.97	44.61
FB6T	97.856.454	68.176.276	69.67	30.33	75.18	63.37	12.64	48.85
FB9S	82.580.253	51.376.709	62.21	37.79	71.31	55.18	6.43	35.80
FB9T	108.807.134	71.019.486	65.27	34.73	75.88	64.26	12.50	49.46
FB10S	119.837.164	76.096.171	63.50	36.50	75.73	65.00	14.50	52.90
FB10T	139.474.926	98.155.548	70.38	29.62	80.07	71.41	21.71	68.13
Média total	109.856.191	72.440.749	66	34	73.97	62.51	13.73	50.84
tumores desmóides associados à FAP								
FB1S	147.429.448	101.213.110	68.65	31.35	81.87	73.21	23.57	72.60
FB1T	138.663.101	100.559.963	72.52	27.48	81.26	72.73	23.25	71.85
FB7S	72.101.860	45.113.562	62.57	37.43	55.44	44.90	6.93	31.29
FB7T	123.695.002	83.123.799	67.20	32.80	77.70	67.60	16.47	57.70
FB8S	113.023.660	69.341.965	61.35	38.65	76.67	63.45	11.72	48.23
FB8T	101.349.966	67.275.686	66.38	33.62	58.37	51.13	14.52	46.78
Média total	133.876.756	91.976.623	68	32	77.25	67.15	20.49	65.67

As alterações somáticas foram identificadas pelo programa *Bioscope* e pelo programa *SHRiMP*, de acordo com os seguintes critérios: a) uma cobertura mínima de 10 *reads*, b) frequência da variante em no mínimo 10% das sequências. Dentre os tumores desmóides esporádicos, no total foram detectadas 395 SNVs (variações de nucleotídeos) e 480 INDELS (inserções e deleções), uma média de 132 SNVs (mínimo 78 e máximo 292) e 160 INDELS (mínimo 35 e máximo 138) foram detectadas para cada paciente. A maioria das SNVs encontradas foram do tipo missense. De forma detalhada foram encontradas 673 missense, 10 nonsense, 16 sítios de splice nas extremidades 3' ou 5'; e 480 INDELS: 373 frameshift e 7 sítio de splice na extremidade 3'. Nos tumores desmóides associados à FAP, todas as mutações germinativas encontradas no gene *APC* através do sequenciamento automático por Sanger também foram identificadas pelo sequenciamento do exoma através do SOLiD, tanto nas amostras tumorais quanto nas amostras de sangue periférico. Em relação às alterações somáticas, os mesmos critérios utilizados para os tumores desmóides esporádicos foram utilizados para os tumores desmóides associados à FAP. No total, foram detectadas 836 SNVs e 152 INDELS, uma média de 139 SNVs (mínimo 114 e máximo 153) e 51 INDELS (mínimo 34 e máximo 63) foram detectadas para cada paciente. A maioria das SNVs encontradas foram do tipo missense, sendo: 163 missense, 7 nonsense, 2 sítios de splice nas extremidades 3' ou 5'; e 92 INDELS: 124 frameshift e 1 sítio de splice na extremidade 3' (Tabela 4).

Tabela 4 - Variações somáticas presentes nas amostras dos tumores desmóides (não presentes nos leucócitos das respectivas amostras) e ausentes no dbSNP

Tipo de alteração	FB1*	FB2	FB3	FB4	FB5	FB6	FB7*	FB8*	FB9	FB10
Total: SNVs	128	292	78	120	123	130	114	153	210	129
Nonsense	4	3	0	1	1	3	1	1	2	0
Missense	61	163	53	73	78	92	41	61	136	78
Sinônimas	21	121	24	45	43	33	20	20	66	51
Sítio de splicing	1	5	1	1	1	2	1	0	6	0
Total: INDELS	34	138	35	42	55	48	55	63	129	33
CDS	34	136	34	42	55	46	54	63	128	32
Sítio de Splicing	0	2	1	0	0	2	1	0	1	1

* Tumores desmóides associados à FAP

Todas as variações encontradas posteriormente passaram por uma análise visual através do programa *CLC Genomics Workbench (CLCbio)* para confirmar que só estavam presentes nas amostras tumorais e que a sequência estava com uma qualidade boa. Dentre todas as variações encontradas e analisadas através do *CLCbio*, escolhemos as alterações observadas na Tabela 5 para serem validadas.

Após a análise visual, foram selecionadas 49 alterações para validação (identificadas em 36 genes distintos), das quais 41 reportam substituições de uma base que levam a uma troca de aminoácido, 5 reportam a substituições de uma base que gera um codon de parada prematura e 3 reportam uma deleção de base.

Tabela 5 - Variações escolhidas para validação inicial

Amostra(s)	Cromossomo	Posição	Ref	Var	Região	Gene
FB2T	10	101611359	A	T	CDS	ABCC2
FB1T	3	64607988	T	G	CDS	ADAMTS9
FB2T	1	154574475	G	A	CDS	ADAR
FB3T	1	154574475	G	A	CDS	ADAR
FB4T	4	73956597	G	A	CDS	ANKRD17
FB6T	11	129062050	A	T	CDS	ARHGAP32
FB4T	3	62503858	G	A	CDS	CADPS
FB3T	16	67863762	G	C	CDS	CENPT
FB6T	16	67863762	G	C	CDS	CENPT
FB5T	11	125503234	A	G	CDS	CHEK1
FB7T	11	125503234	A	G	CDS	CHEK1
FB2T	3	1427454	CC	C	CDS	CNTN6
FB3T	3	41266137	C	T	CDS	CTNNB1
FB5T	3	41266137	C	T	CDS	CTNNB1
FB10T	3	41266137	C	T	CDS	CTNNB1
FB4T	4	41983939	C	T	CDS	DCAF4L1
FB4T	7	154519476	G	A	SpSite	DPP6
FB5T	7	154519476	G	A	SpSite	DPP6
FB1T	17	17997141	C	A	CDS	DRG2
FB5T	17	17997141	C	A	CDS	DRG2
FB9T	19	49657552	C	T	CDS	HRC
FB7T	2	198363406	G	A	CDS	HSPD1
FB8T	2	198363406	G	A	CDS	HSPD1
FB9T	2	198363406	G	A	CDS	HSPD1
FB6T	10	33217106	T	C	CDS	ITGB1
FB4T	22	33733642	T	G	CDS	LARGE
FB8T	19	12958435	CTC	C	CDS	MAST1
FB1T	14	47504232	C	T	CDS	MDGA2
FB7T	14	47504232	C	T	CDS	MDGA2
FB9T	4	99956609	T	G	CDS	METAP1
FB2T	19	36223242	C	A	CDS	MLL4
FB9T	1	16975289	T	A	SpSite	MST1P2
FB2T	11	47660301	A	T	CDS	MTCH2
FB5T	11	47660301	A	T	CDS	MTCH2
FB5T	1	38301376	G	T	CDS	MTF1
FB8T	1	38301376	G	T	CDS	MTF1
FB3T	19	54313733	T	A	CDS	NLRP12
FB6T	19	54313733	T	A	CDS	NLRP12
FB10T	11	55861279	TT	T	CDS	OR8I2
FB6T	14	39650980	G	T	CDS	PNN
FB2T	19	49377794	G	A	CDS	PPP1R15A
FB1T	1	12919991	A	G	CDS	PRAMEF2
FB6T	3	133583460	A	G	CDS	RAB6B
FB7T	14	102729886	G	A	CDS	RAGE
FB8T	3	164716365	G	T	CDS	SI
FB2T	12	20893178	A	G	CDS	SLCO1C1
FB4T	13	37427573	G	A	CDS	SMAD9
FB8T	13	103296931	A	G	CDS	TPP2
FB2T	5	94830497	T	C	CDS	TTC37

4.5 VALIDAÇÃO POR SANGER

De acordo com as análises de bioinformática, a maioria das alterações encontradas foi observada nos tumores em uma frequência menor do que 15%. Dessa forma, foi decidido que, a princípio, para se ter um melhor entendimento e certeza que o sequenciamento automático (Sanger) seria sensível suficiente para detectar as mutações encontradas pelo sequenciamento em larga escala, a validação por Sanger seria feita primeiro, como um teste, em 4 alterações somente, uma vez que a sensibilidade do Sanger não é tão alta. Escolhemos validar as alterações encontradas nos genes *MTCH2*, *HSPD1*, *ADAR* e *CADPS*, uma vez que essas alterações apareceram em mais de um paciente e/ou com uma frequência em torno de 13%. Além disso, a maioria das amostras apresentou uma cobertura de *reads* maior do que 50x para essas alterações (Tabela 6). Dentre essas 4 mutações, 2 alterações (*HSPD1* e *ADAR*) reportam uma substituição de bases com troca de aminoácido e 2 (*MTCH2* e *CADPS*) reportam uma substituição de bases que resulta em um códon de parada prematura.

Os primers para essas alterações escolhidas foram desenhados, os PCRs padronizados e sequenciados. Além desses 4 genes, optamos por analisar novamente o sequenciamento por Sanger para o gene *CTNNB1* para as amostras FB3T, FB5T e FB10T, uma vez que na análise inicial não foi encontrada mutação para este gene, mas o sequenciamento do exoma detectou uma mutação bem característica dos tumores desmóides no gene

CTNNB1 no códon 45 (p.S45F) com uma frequência em torno de 10%, como pode ser observado na Figura 18.

Tabela 6 - Variações escolhidas para validação inicial por sequenciamento capilar

Gene	Amostras	Crom.	Posição	total reads	% alterado	Mudança proteína	Mudança cDNA	Resultado da validação
<i>MTCH2</i>	FB5T	11	47660301	64	13%	p.Arg77*	c.229A>T	Não validado
<i>ADAR</i>	FB2T	1	154574475	74	12%	p.Gly215Ser	c.643G>A	Não validado
<i>ADAR</i>	FB3T	1	154574475	43	12%	p.Gly215Ser	c.643G>A	Não validado
<i>HSPD1</i>	FB8T	2	198363406	43	16%	p.Gly56Glu	c.167G>A	Não validado
<i>HSPD1</i>	FB9T	2	198363406	66	12%	p.Gly56Glu	c.167G>A	Não validado
<i>CADPS</i>	FB4T	3	62503858	44	41%	p.Arg787*	c.2359C>T	Validado

Crom. - Cromossomo

Para amplificação das regiões com as alterações encontradas, foram utilizados primers que flanqueavam a alteração e que amplificavam fragmentos de aproximadamente 300 pb. Em seguida, foi realizado o sequenciamento capilar.

Os dados mostraram que não foi possível validar nenhuma das 2 alterações que resultam em substituição de base com troca de aminoácidos (figura 19). Já em relação às alterações que resultam em um códon de parada prematura, das 2 alterações encontradas pelo sequenciamento do exoma, o sequenciamento automático (Sanger) foi capaz de validar somente a mutação do gene *CADPS* (Figura 20). Entretanto, é importante ressaltar que a frequência da variante mutada no caso específico dessa mutação é de quase de 50%. Dessa forma, a validação dessa mutação, apesar de importante, não torna claro se o sequenciamento automático pelo método de

Sanger é suficientemente sensível para ser usado na validação de mutações onde a frequência da variante mutada é relativamente baixa.

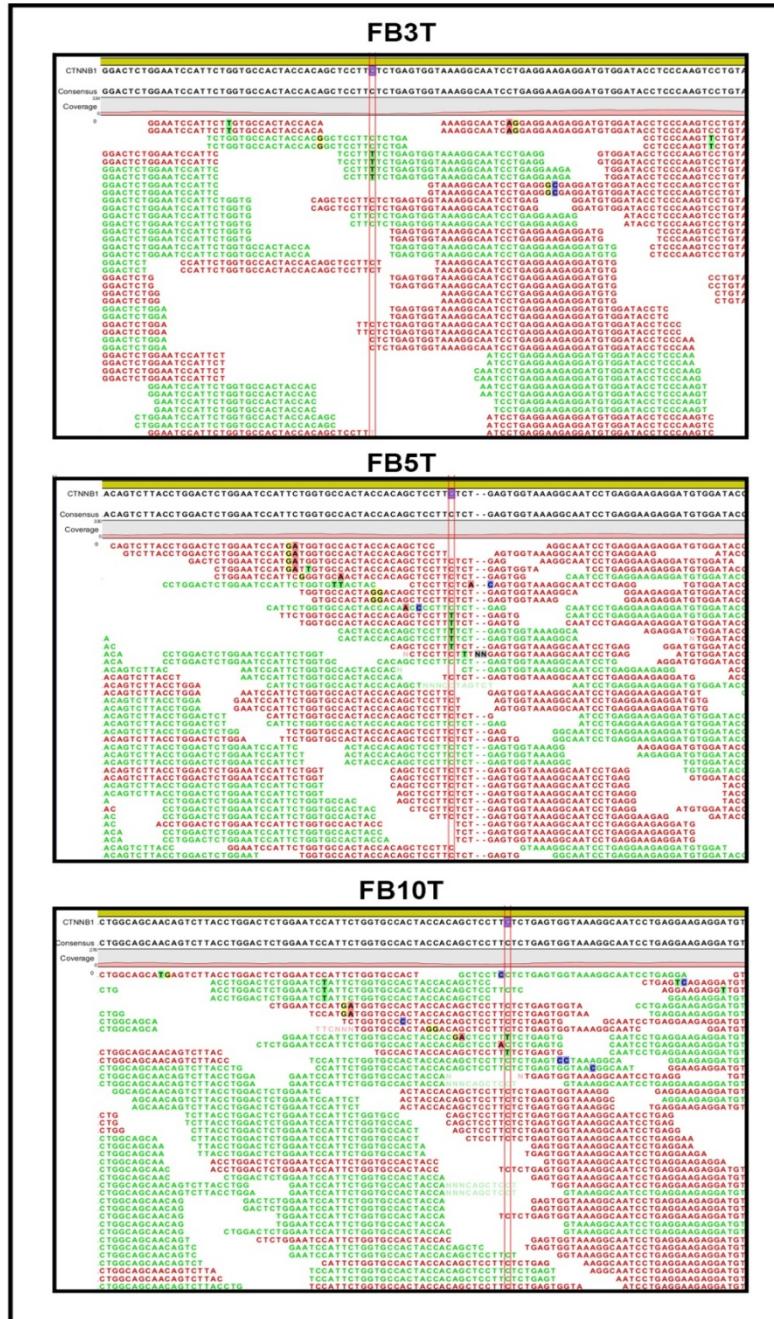


Figura 18 - Sequenciamento do exoma. Sequência obtida através do sequenciamento do exoma mostrando uma alteração no gene CTNNB1 nas amostras FB3T, FB5T e FB10T.

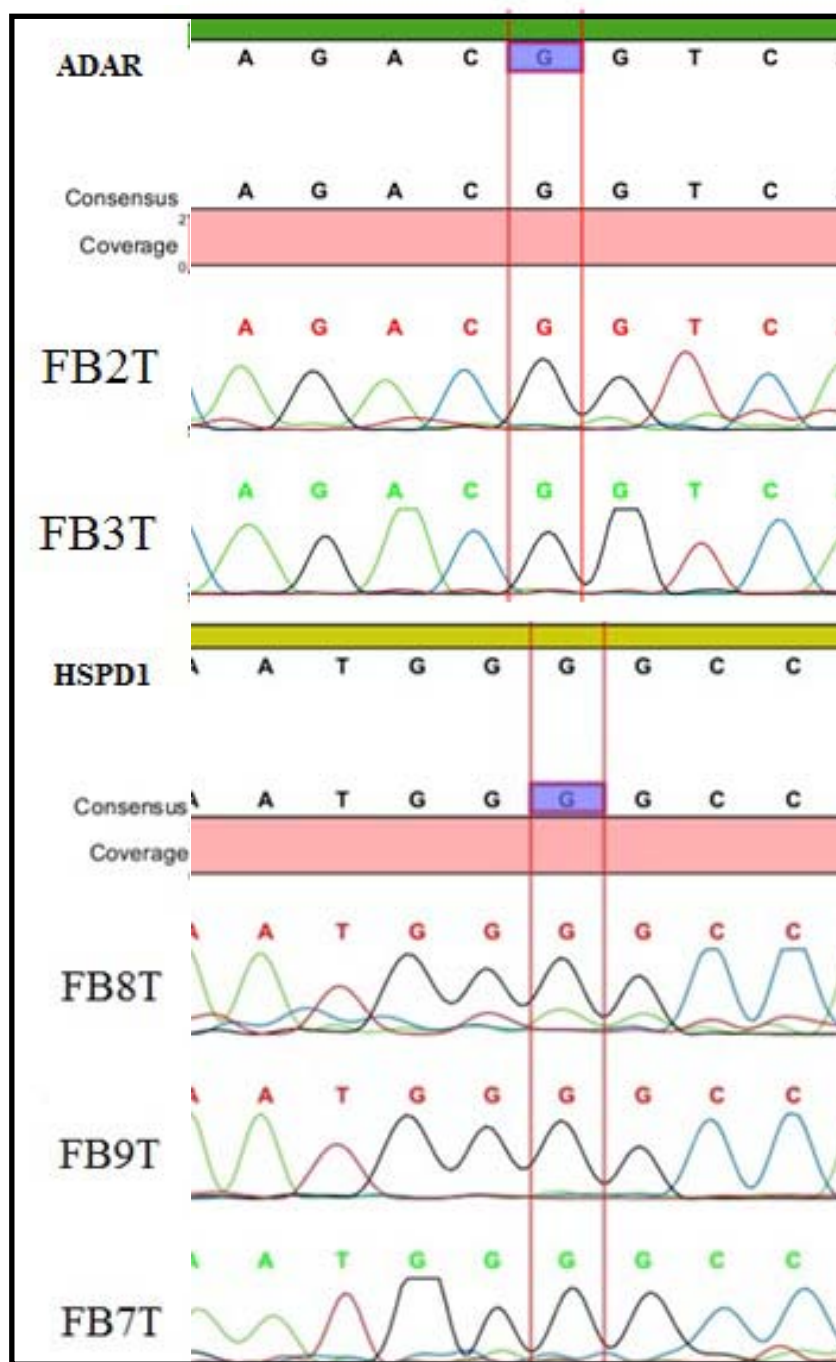


Figura 19 - Validação do sequenciamento do exoma (*ADAR* e *HSPD1*). Sequenciamento por Sanger mostrando seqüências selvagens para os genes *ADAR* e *HSPD1*.

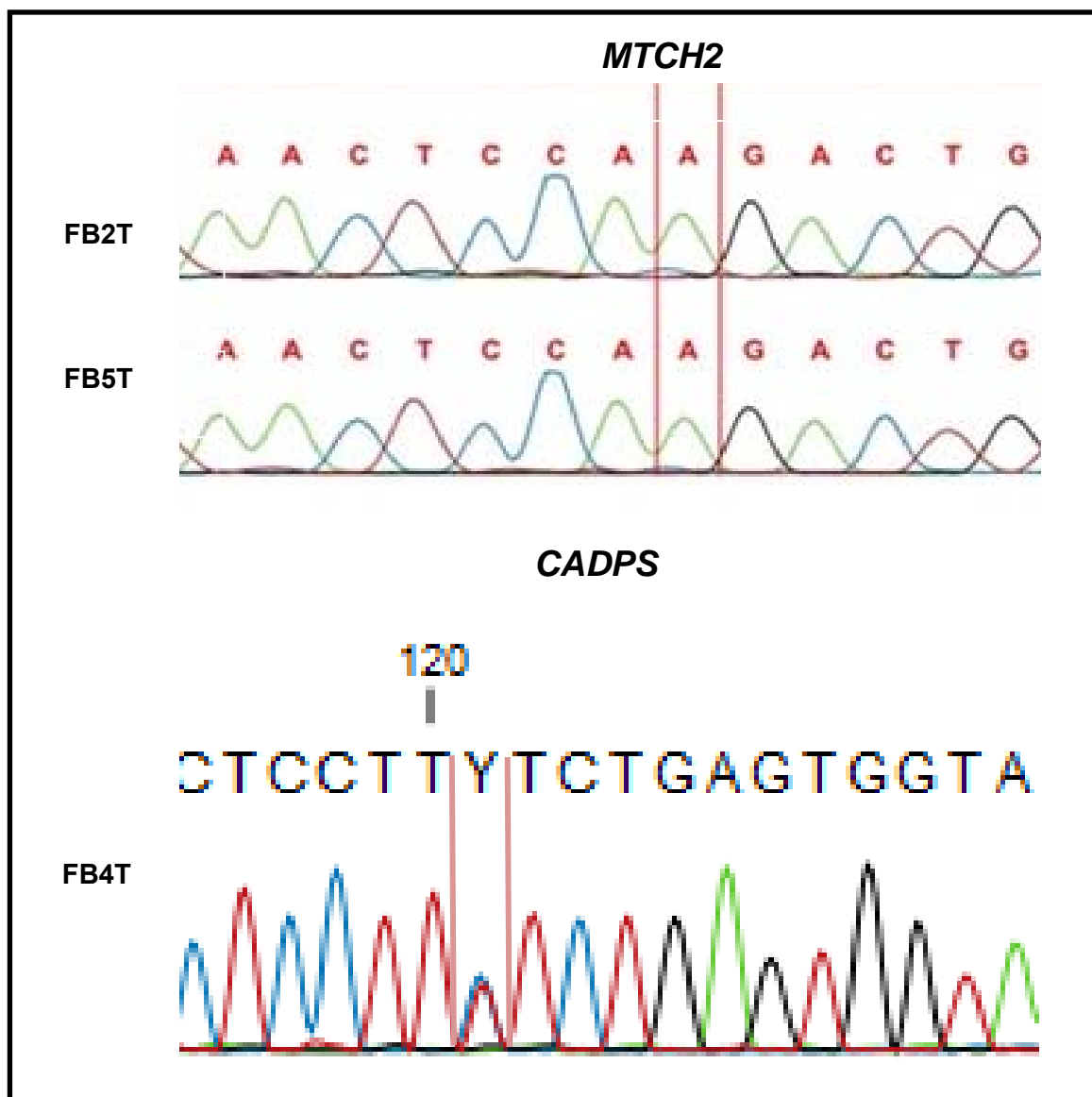


Figura 20 - Validação do sequenciamento do exoma (*CADPS* e *MTCH2*). Sequenciamento por Sanger mostrando sequências selvagens para o gene *MTCH2* e a mutação no gene *CADPS*.

Da mesma forma, também não foi possível validar a alteração encontrada no gene *CTNNB1*, como pode ser observado na Figura 21. Por ser tratar de uma alteração já relatada e muito característica dos tumores desmóides, acreditamos ser uma alteração real e não algum artefato produzido pelo sequenciamento do exoma. Entretanto, a sensibilidade do

sequenciamento por Sanger não se mostrou suficiente para validar alterações em baixa frequência, como é esperado. Esses resultados, juntamente com os resultados do sequenciamento dos genes *ADAR*, *HSPD1* e *MTCH2*, que no caso específico desse trabalho, onde a frequência das variantes mutadas era relativamente baixa, mostraram o sequenciamento automático pelo método de Sanger não é a metodologia mais precisa para ser utilizada na validação dos dados obtidos através do sequenciamento do exoma. Dessa forma, optamos por validar todas as alterações através da construção de um painel de primers customizado (Ion AmpliSeq™), utilizando o sequenciador *Ion PGM™ System*, o que nos dará uma maior cobertura e, conseqüentemente, maior sensibilidade para detecção de variantes com baixa frequência.

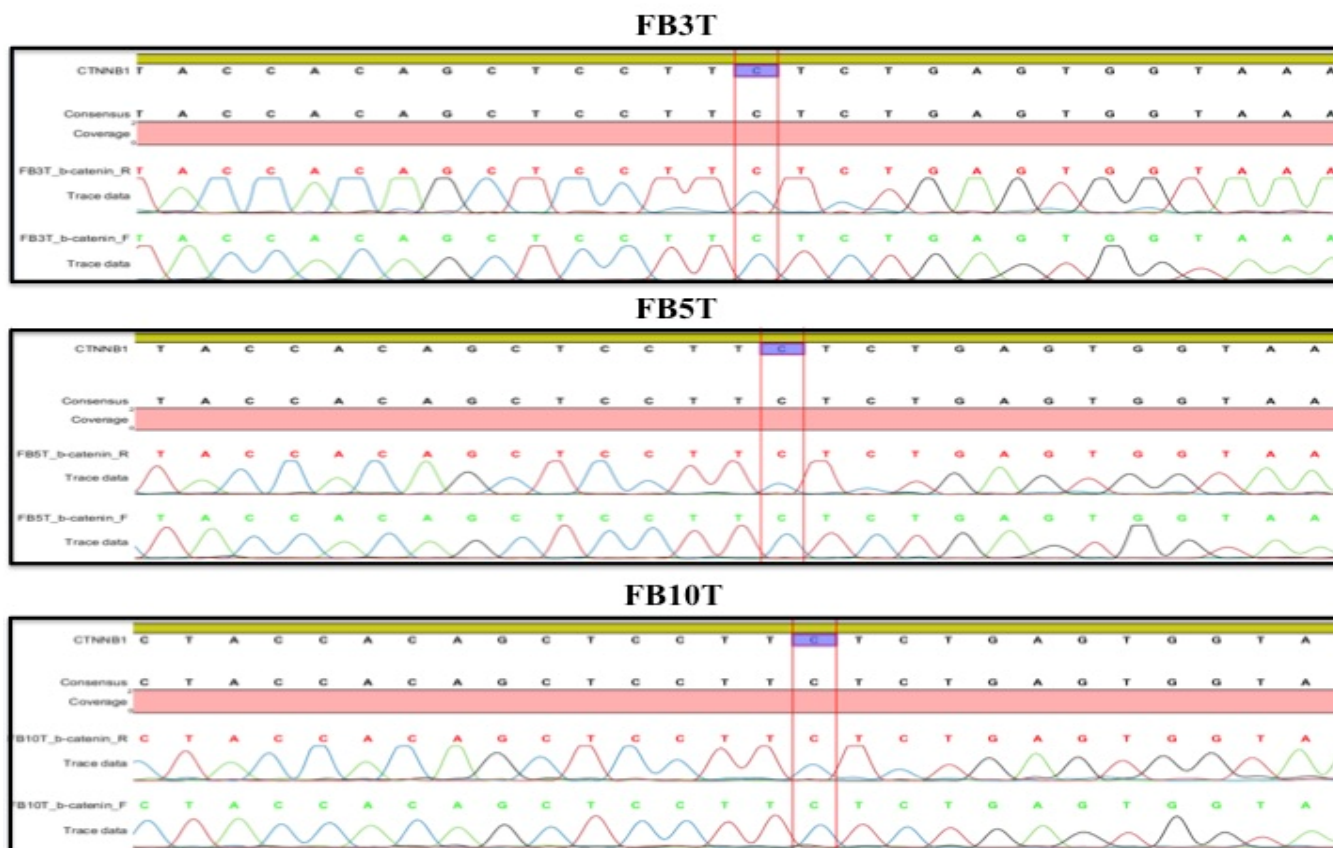


Figura 21 - Validação do sequenciamento do exoma (*CTNNB1*). Eletroferograma mostrando a ausência de alteração no códon 45 do gene *CTNNB1* nas amostras FB3T, FB5T e FB10T.

4.6 VALIDAÇÃO POR SEQUENCIAMENTO NGS E PAINEL DE GENES (*TARGET SEQ*) UTILIZANDO ION AMPLISEQ™ E PLATAFORMA ION PGM

Assim, para a validação do sequenciamento do exoma, optamos por utilizar o sequenciamento de nova geração NGS (do inglês, *next generation sequencing*) por *target sequencing* (sequenciamento alvo utilizando painel de genes). Para isso, foi confeccionado um painel contendo 170.2 kb, com genes completos e com 1.066 amplicons divididos em 2 pools. A variação dos tamanhos de amplicon foi de 125-275 pb. Todas as alterações escolhidas para serem validadas foram analisadas através do sequenciamento pelo Ion AmpliSeq™, através do equipamento *Ion PGM™ System*. As *reads* obtidas no sequenciamento foram mapeadas e analisadas contra a sequência referência respectiva de cada gene estudado, disponibilizada pelo National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Obtivemos uma cobertura média dos pacientes incluídos nos tumores e controles de 153x quando consideramos todas as alterações encontradas nos genes analisados, o que é considerada adequada (Tabela 7).

Tabela 7 - Resultados da cobertura do sequenciamento (*target seq*) do painel de genes

Amostra	Total de Fragmentos	% Reads on targets	% Reads off targets	% Targets coverage >10x	% Targets coverage >20x	% Targets coverage >100x	Cobertura Média
FB1T*	247.635	93.91	6.09	97.79	97.31	84.55	203
FB2T	208.399	94.34	5.66	97.63	96.8	80.42	175
FB3T	201.356	94.31	5.69	97.74	97	83.71	188
FB4T	190.027	94.11	5.89	97.06	94.93	64.78	151
FB5T	181.603	93.95	6.05	97.4	96.13	73.96	152
FB6T	61.396	95.08	4.92	88.51	75.97	13.04	52
FB7T*	204.799	95.14	4.86	74.72	63.4	49.59	171
FB8T*	199.198	93.69	6.31	97.65	97.05	81.3	165
FB9T	217.510	94.11	5.89	97.69	96.66	83.86	183
FB10T	107.630	94.2	5.8	96.18	94.01	37.73	90
Média total	181.955	94	6	94	91	65	153

* Tumores desmóides associados à FAP

Das 49 alterações selecionadas, 15 (30.6%) tiveram a mutação validada, 6 (12.2%) não validaram como mutações somáticas, pois as alterações também foram encontradas no sangue, e 28 (57.2%) não validaram porque a alteração realmente não foi identificada no sequenciamento (Tabela 8).

Tabela 8 - Alterações analisadas nos tumores desmóides através de sequenciamento alvo (*Target-seq*) por Ion AmpliSeq™

Amostras	Crom	Posição	Gene	Tipo de Alteração	alteração cDNA	Alteração proteína	Seq exoma		Target Seq	Resultado da Validação
							Cobertura Tumor	Freq tumor (%)	>100x % cobertura do gene	
FB2	10	101611359	ABCC2	NSY	c.4609A>T	p.Ile1537Phe	26	30	94.5	Validada
FB1	3	64607988	ADAMTS9	NSY	c.2572A>C	p.Lys858Gln	36	14	94.1	Não validada
FB2	1	154574475	ADAR	NSY	c.643G>A	p.Gly215Ser	74	12	89	Não validada
FB3	1	154574475	ADAR	NSY	c.643G>A	p.Gly215Ser	43	12	88.5	Não validada
FB4	4	73956597	ANKRD17	NSY	c.6748C>T	p.Pro2250Ser	69	39.1	74.1	Validada
FB6	11	129062050	ARHGAP32	NSY	c.44T>A	p.Val15Asp	37	40.5	12.1	Validada
FB4	3	62503858	CADPS	STP	c.2359C>T	p.Arg787*	44	40.9	63.4	Validada
FB3	16	67863762	CENPT	NSY	c.1092C>G	p.His364Gln	36	25	76.5	Não validada
FB6	16	67863762	CENPT	NSY	c.1092C>G	p.His364Gln	29	10.4	5.94	Não validada
FB5	11	125503234	CHEK1	NSY	c.601A>G	p.Met201Val	10	40	88.5	Não somática
FB7	11	125503234	CHEK1	NSY	c.601A>G	p.Met201Val	32	37.5	63.5	Não somática
FB3	3	41266137	CTNNB1	NSY	c.134C>T	p.Ser45Phe	25	8	89.7	Validada
FB5	3	41266137	CTNNB1	NSY	c.134C>T	p.Ser45Phe	50	6	80.1	Validada
FB10	3	41266137	CTNNB1	NSY	c.134C>T	p.Ser45Phe	32	9.4	47.6	Validada
FB4	4	41983939	DCAF4L1	NSY	c.130C>T	p.Arg44Cys	56	23.2	100	Validada
FB4	7	154519476	DPP6	Sps	c.763-1G>A	-	29	17	34.2	Não somática
FB5	7	154519476	DPP6	Sps	c.763-1G>A	-	28	21	58.0	Não somática
FB1	17	17997141	DRG2	NSY	c.79C>A	p.Leu27Met	35	5.7	68.0	Não validada
FB5	17	17997141	DRG2	NSY	c.79C>A	p.Leu27Met	29	31.8	56.5	Não validada
FB9	19	49657552	HRC	NSY	c.943G>A	p.Gly315Arg	82	15	68.8	Não validada
FB7	2	198363406	HSPD1	NSY	c.167G>A	p.Gly56Glu	34	24	56.5	Não validada
FB8	2	198363406	HSPD1	NSY	c.167G>A	p.Gly56Glu	43	16	96.1	Não validada
FB9	2	198363406	HSPD1	NSY	c.167G>A	p.Gly56Glu	66	12	98.9	Não validada
FB6	10	33217106	ITGB1	NSY	c.463A>G	p.Met155Val	46	50	11.8	Validada
FB4	22	33733642	LARGE	NSY	c.1277A>C	p.Asn426Thr	22	54.5	50.3	Validada
FB1	14	47504232	MDGA2	NSY	c.1594G>A	p.Val532Met	44	4.8	87.2	Não validada

FB7	14	47504232	<i>MDGA2</i>	NSY	c.1594G>A	p.Val532Met	32	21.9	55.2	Não validada
FB9	4	99956609	<i>METAP1</i>	STP	c.338T>G	p.Leu113*	22	31.9	90.8	Não validada
FB2	19	36223242	<i>MLL4</i>	NSY	c.5792C>A	p.Pro1931His	11	55	43.1	Não somática
FB9	1	16975289	<i>MST1P2</i>	Sps	c.584-1T>A	-	59	19	90.8	Não validada
FB2	11	47660301	<i>MTCH2</i>	STP	c.229A>T	p.Arg77*	64	13	83.8	Não validada
FB5	11	47660301	<i>MTCH2</i>	STP	c.229A>T	p.Arg77*	36	22	76.3	Não validada
FB5	1	38301376	<i>MTF1</i>	NSY	c.820C>A	p.His274Asn	28	25	76.3	Não validada
FB8	1	38301376	<i>MTF1</i>	NSY	c.820C>A	p.His274Asn	15	20	82.7	Não validada
FB3	19	54313733	<i>NLRP12</i>	NSY	c.1180A>T	p.Asn394Tyr	32	25	99.2	Não validada
FB6	19	54313733	<i>NLRP12</i>	NSY	c.1180A>T	p.Asn394Tyr	44	15.9	16.9	Não validada
FB6	14	39650980	<i>PNN</i>	NSY	c.2067G>T	p.Arg689Ser	26	34.6	12.6	Validada
FB2	19	49377794	<i>PPP1R15A</i>	NSY	c.1304G>A	p.Arg435Gln	73	16	75.4	Não validada
FB1	1	12919991	<i>PRAMEF2</i>	NSY	c.731A>G	p.His244Arg	32	21.9	61.3	Não validada
FB6	3	133583460	<i>RAB6B</i>	NSY	c.97T>C	p.Phe33Leu	22	27.3	11.6	Não validada
FB7	14	102729886	<i>RAGE</i>	STP	c.280C>T	p.Arg94*	15	47	37.8	Não validada
FB8	3	164716365	<i>SI</i>	NSY	c.4503C>A	p.Asn1501Lys	57	31.6	80.9	Validada
FB2	12	20893178	<i>SLCO1C1</i>	NSY	c.1609A>G	p.Ile537Val	43	27.9	83.9	Validada
FB4	13	37427573	<i>SMAD9</i>	NSY	c.1243C>T	p.Arg415Trp	21	42.9	51.5	Não somática
FB8	13	103296931	<i>TPP2</i>	NSY	c.2200A>G	p.Ile734Val	41	39	81.8	Validada
FB2	5	94830497	<i>TTC37</i>	Sps	c.878-108106T>C	-	41	29.7	92.4	Validada

Crom. – Cromossomo; NSY – mutação missense; Sps – Sítio de *splicing* alternativo; STP – mutação que resulta em códon de parada prematura

As características do NGS e a patogenicidade de cada mutação validada podem ser observadas com mais detalhes na Tabela 9. Dentre as alterações validadas, nenhuma tinha sido relatada na literatura. Entretanto, existem vários estudos mostrando a relação do gene *ITGB1*, *ANKRD17*, *ARHGAP32* e *SI* com diversos tipos tumorais, entre eles colorretal, cólon e estômago.

O gene *PNN* já foi relacionado em estudos anteriores com a via WNT, no entanto, nenhum outro gene encontrado alterado em nosso estudo parece ter relação com a via WNT/ α -catenina, o que sugere que realmente a mutação na β -catenina é o fator principal na tumorigênese dos tumores desmóides, reforçando a teoria conhecida como “*oncogene addiction*”. De toda forma, estudos posteriores serão de extrema importância para o melhor entendimento da relação dessas alterações com a tumorigênese dos tumores desmóides.

Além dessas mutações mencionadas acima, a mutação no gene *CTNNB1* nas amostras FB3T, FB5T e FB10T também foi validada (Figura 22), o que corrobora diversos estudos que mostram que os tumores desmóides são dependentes da via WNT, especialmente da β -catenina. Esse dado é de grande importância, pois sugere que o fato de existirem tumores desmóides esporádicos que não apresentam mutação para *CTNNB1* pode ser simplesmente um artefato causado pela falta de sensibilidade do método empregado para análise da mutação.

Além disso, essa mutação no gene *CTNNB1* é a provável explicação da localização nuclear da α -catenina nas amostras FB3T, FB5T e FB10T, fato que anteriormente era de difícil compreensão, uma vez que acreditávamos que esses casos apresentavam o gene *CTNNB1* selvagem.

Tabela 9 - Mutações somáticas validadas nos tumores desmóides através do Ion AmpliSeq™

Amostras	Gene	Tipo de Alteração	Seq exoma		Seq Ion		Análise <i>in silico</i>		
			Cobertura Tumor	Freq tumor (%)	Cobertura Tumor	Freq tumor (%)	SIFT	Polyphen-2	Mutation Taster
FB2T	<i>ABCC2</i>	NSY	26	30	258	39.5	Patogênica	Provavelmente	Polimorfismo
FB4T	<i>ANKRD17</i>	NSY	69	39.1	266	40.6	Tolerada	Provavelmente	CD
FB6T	<i>ARHGAP32</i>	NSY	37	40.5	39	38.5	Patogênica	Provavelmente	CD
FB4T	<i>CADPS</i>	STP	44	40.9	52	51.9	N/A	N/A	N/A
FB3	<i>CTNNB1</i>	NSY	25	8	77	22.1	Patogênica	Provavelmente	CD
FB5	<i>CTNNB1</i>	NSY	50	6	52	28.9	Patogênica	Provavelmente	CD
FB10	<i>CTNNB1</i>	NSY	32	9.4	60	36.7	Patogênica	Provavelmente	CD
FB4T	<i>DCAF4L1</i>	NSY	56	23.2	214	45.8	Patogênica	Provavelmente	Polimorfismo
FB6T	<i>ITGB1</i>	NSY	46	50	76	34.2	Patogênica	Provavelmente	Polimorfismo
FB4T	<i>LARGE</i>	NSY	22	54.5	76	43.4	Tolerada	Benigna	Polimorfismo
FB6T	<i>PNN</i>	NSY	26	34.6	72	26.4	Patogênica	Provavelmente	Polimorfismo
FB8T	<i>SI</i>	NSY	57	31.6	162	38.2	Patogênica	Provavelmente	Polimorfismo
FB2T	<i>SLCO1C1</i>	NSY	43	27.9	68	60.3	Tolerada	Benigna	Polimorfismo
FB8T	<i>TPP2</i>	NSY	41	39	134	34.2	Tolerada	Benigna	CD
FB2T	<i>TTC37</i>	NSY	41	29.7	272	37.5	Tolerada	Benigna	CD

NSY – do inglês, *Nonsynonymous substitution*; STP – do inglês, *stop codon*; CD – causadora de doença

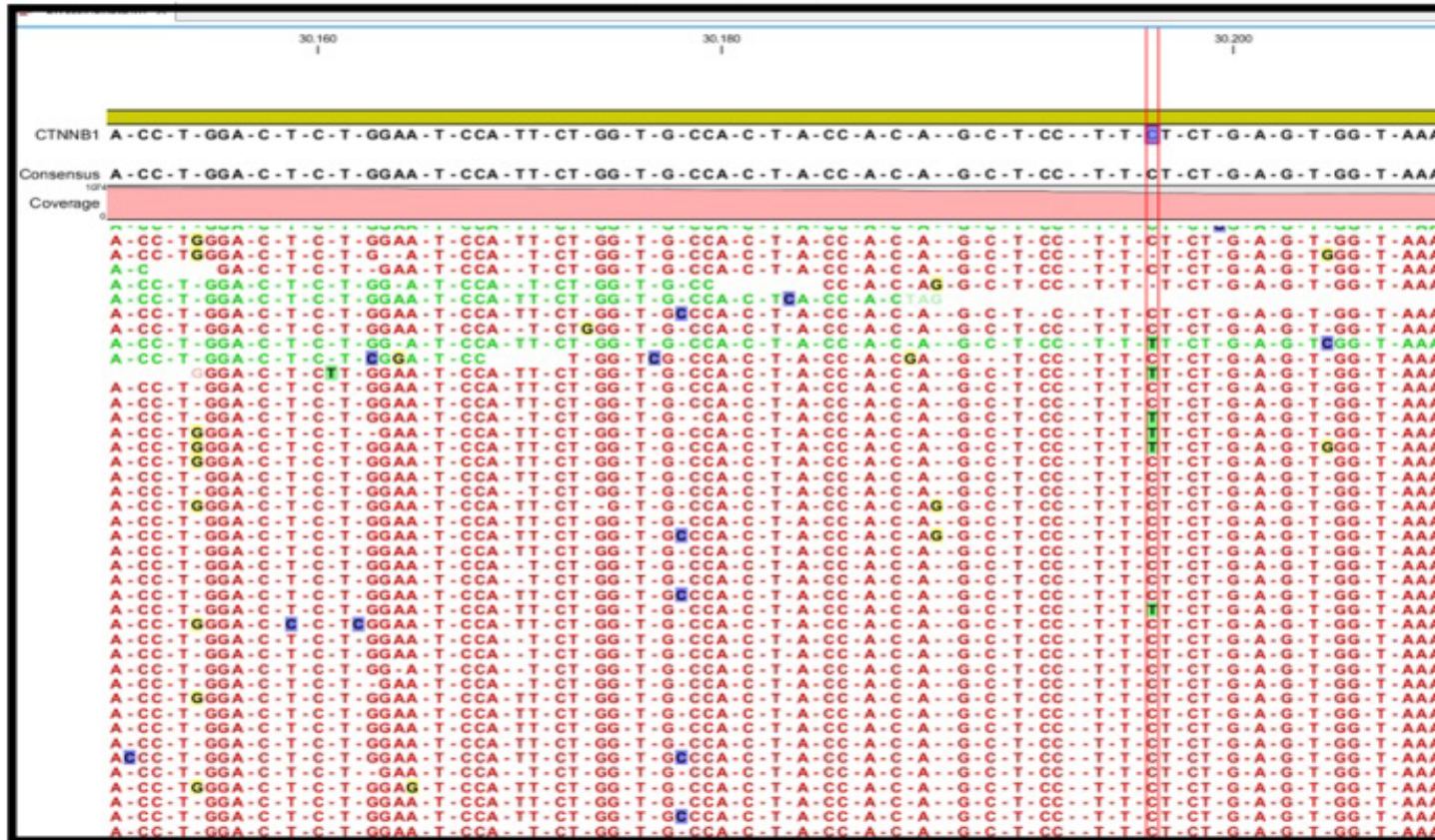


Figura 16 - Alinhamento das leituras obtidas pelo sequenciamento na plataforma Ion Torrent contra a sequência genômica. O alinhamento da sequência do paciente FB3T, obtida através do sequenciamento alvo, identifica a mutação p.S45F do gene *CTNNB1*.

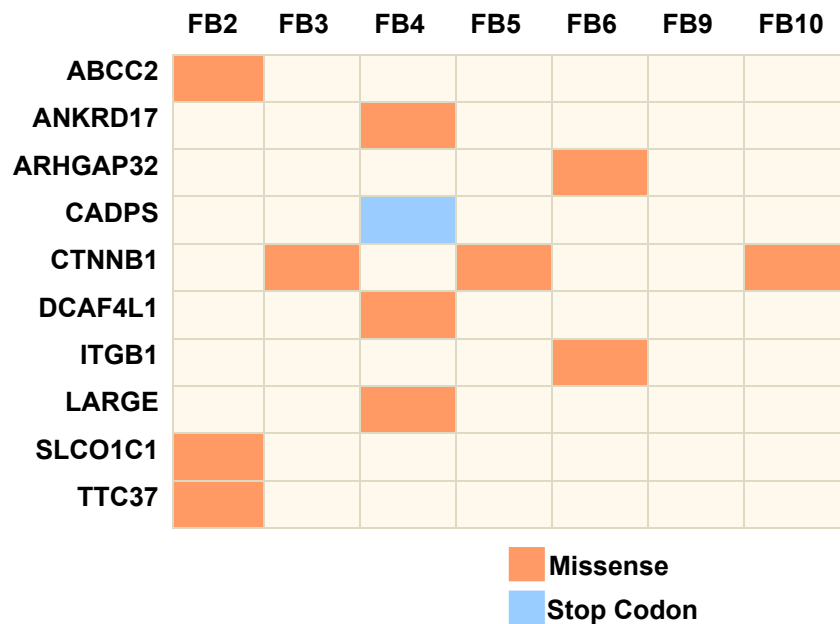


Figura 17 - Distribuição dos genes potencialmente associados aos tumores desmóides esporádicos.

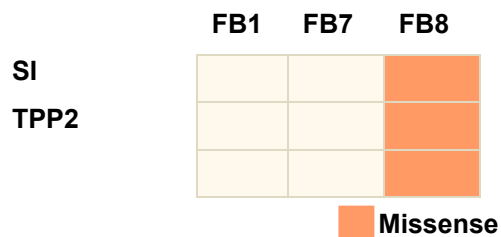


Figura 184 - Distribuição dos genes potencialmente associados aos tumores desmóides associados à FAP.

4.7 SEQUENCIAMENTO AUTOMÁTICO X SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO NA DETECÇÃO DA MUTAÇÃO DO GENE *CTNNB1*

Devido à importância da mutação do gene *CTNNB1* na biologia dos tumores desmóides e, principalmente, no diagnóstico diferencial desses tumores, a identificação da metodologia mais sensível e específica para se analisar o status mutacional desse gene torna-se de extrema relevância.

A sensibilidade do NGS (SOLiD + Ion PGM) para a detecção de mutações no gene *CTNNB1* em tumores desmóides esporádicos na nossa casuística foi 100% (7/7). A especificidade do NGS nas amostras incluídas nesse estudo também foi de 100%, uma vez que não foram detectadas mutações no gene *CTNNB1* nos 3 tumores desmóides associados à FAP. Dentro deste mesmo grupo de amostras incluídas, a sensibilidade do sequenciamento automático por Sanger foi de 57.1% (4/7).

Tabela 10 - Concordância entre os resultados do sequenciamento automático por Sanger e do sequenciamento de nova geração

		Sequenciamento de nova geração		Total
		Mutação detectada	Mutação não detectada	
Sequenciamento Automático por Sanger	Mutação detectada	4	0	4
	Mutação não detectada	3	0	3
	Total	7	0	

Tabela 11 - Detalhes da concordância entre os resultados do sequenciamento automático por Sanger e do sequenciamento de nova geração

		Sequenciamento de nova geração			Total
		T41A	S45F	S45P	
Sequenciamento automático por Sanger	Mutação detectada	2	1	1	4
	Mutação não detectada	0	3	0	3
Total		2	4	1	

O sequenciamento de nova geração, especialmente o que foi utilizado nesse trabalho, chamado de sequenciamento alvo (*target sequencing*), tem a vantagem de em um único experimento detectar mutações múltiplas nos genes de interesse, o que torna o seu custo-benefício excelente para uso na prática clínica. Nossos resultados mostram que o sequenciamento automático do tipo Sanger, junto com o fato que as mutações do gene *CTNNB1* se apresentam em alta frequência nos tumores desmóides, mas não nas histologias que fazem diagnóstico diferencial com esse tumor, indicam que o método baseado em NGS é ideal para ser usado como um teste de diagnóstico adjuvante dos tumores desmóides.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo caracterizar molecularmente os tumores desmóides através da identificação de alterações presentes no exoma desses tumores, utilizando para isso o sequenciamento de nova geração.

Os tumores desmóides são proliferações mesenquimais fibroblásticas extremamente invasivas localmente, mas que não possuem a habilidade de originar metástase. Esses tumores, na grande maioria dos casos, são esporádicos, mas também podem estar associados a síndromes genéticas, como a polipose adenomatosa familiar (FAP). Os estudos nos tumores desmóides associados com a síndrome FAP revelaram que a via Wnt/ β -catenina se encontra desregulada nesses tumores, tanto nos esporádicos quanto aos associados à FAP. Essa desregulação da via Wnt culmina no acúmulo de β -catenina nuclear, que é uma característica comum a praticamente quase todos os tumores desmóides (BHATTACHARYA et al. 2005; NG et al. 2005) e ressalta a importância dessa na tumorigênese dos tumores desmóides (BERTARIO et al. 2003).

Mutações germinativas no gene *APC* foram observadas nos tumores desmóides associados à FAP por diversos grupos (MIYAKI et al. 2008; TORREZAN et al. 2013; IKENOUE et al. 2015), entretanto, até o momento, nenhuma outra mutação diferente da do gene *APC* é conhecida por estar associada ao tumores desmóides relacionados à síndrome FAP. Nossos

resultados de sequenciamento automático corroboram esse dado, uma vez que, na nossa casuística, todos os desmóides associados à FAP apresentaram mutação germinativa para o gene *APC*. Alguns trabalhos identificaram um acúmulo de mutações no gene *APC* entre os códons 1016 e 1070 e entre os códons 1265 e 2035 dos pacientes com tumores desmóides associados à FAP. Nossos resultados também identificaram uma frequência maior de mutações entre os códons citados acima (LEFEVRE et al. 2008; MIYAKI et al. 2008; SCHIESSLING et al. 2013). Dos 3 pacientes com desmóides associados à FAP incluídos nesse trabalho, 2 apresentaram a mutação do gene *APC* nos códons citados acima, sendo que uma mutação foi encontrada no códon 1465 e a outra no códon 1017.

A mutação somática de *APC* também já foi observada nos casos de tumores desmóides esporádicos, entretanto, de forma oposta aos tumores associados à FAP, onde a mutação do gene *APC* se encontra na maioria dos tumores, nos desmóides esporádicos a mutação somática de *APC* é bastante atípica, sendo encontrada em uma frequência em torno de 10% (GIAROLA et al. 1998). Essa baixa frequência de mutação somática no gene *APC*, junto ao pequeno número de amostras incluídas nesse trabalho, pode ser a razão pelo qual nenhuma mutação somática foi encontrada em *APC* nos 7 casos de tumores desmóides esporádicos incluídos na nossa casuística. Semelhante ao demonstrado por vários grupos, nossos resultados de sequenciamento automático por Sanger mostraram uma alta frequência (~57%) de mutação do gene *CTNNB1* (que codifica a proteína β -catenina) nos tumores desmóides esporádicos. De acordo com a literatura, a

frequência de mutação de β -catenina nos desmóides esporádicos identificada através do sequenciamento automático por Sanger varia de 64 a 85% (LAZAR et al. 2008; WANG et al. 2012; COLOMBO et al. 2011, 2013; MULLEN et al. 2013). Até o presente momento, todas as mutações no gene *CTNNB1* encontradas nos tumores desmóides foram reportadas no éxon 3. Curiosamente, dentre todas as mutações relatadas, quase 100% dos tumores desmóides esporádicos apresentam apenas três mutações pontuais em dois códons diferentes (41 e 45). A mutação mais frequente dos tumores desmóides esporádicos ocorre no códon 41 e resulta na substituição de uma treonina por uma alanina (p.T41A), sendo encontrada em aproximadamente 49% dos casos mutados para β -catenina. Nossos resultados corroboram esse dado de frequência, uma vez que dos 4 casos identificados como mutados pelo sequenciamento automático, 2 (50%) apresentaram a mutação citada acima. A segunda mutação mais frequente ocorre no códon 45, resulta em uma troca de serina por fenilalanina (p.S45F) e é encontrada em uma frequência de aproximadamente 32% nos tumores desmóides esporádicos. Na nossa casuística, dos 4 pacientes mutados, identificamos a mutação p.S45F em 1 paciente (25%), o que está bem próximo do reportado na literatura. A terceira mutação mais frequente também ocorre no códon 45 e resulta em uma substituição de serina por prolina (p.S45P). Essa mutação é reportada em aproximadamente 3% dos casos de desmóides esporádicos (LAZAR et al. 2008; COLOMBO et al. 2011, 2013; MULLEN et al. 2013). Dentre os nossos pacientes analisados, encontramos 1 (1/4; 25%) com esta mutação. Até onde é do nosso conhecimento, esse é o primeiro trabalho a

reportar frequências de mutações do gene *CTNNB1* nos tumores desmóides de pacientes compostos pela população brasileira. Uma vez que, sabidamente, a população brasileira é altamente miscigenada, não temos como afirmar se este achado é uma coincidência causada pelo pequeno número de pacientes incluídos nesse estudo ou se é resultado da alta miscigenação da população brasileira. Estudos posteriores, incluindo um maior número de amostras de tumores desmóides, e, se possível, pacientes de diferentes regiões brasileiras, são necessários para identificar com maior precisão a frequência de mutações no gene *CTNNB1* nos tumores desmóides esporádicos de pacientes brasileiros.

O estudo do status mutacional da β -catenina se torna cada vez mais importante, não somente para o melhor entendimento dessa doença, mas também como uma forma de aprimorar o diagnóstico molecular dos tumores desmóides, uma vez que apesar da imuno-histoquímica para β -catenina nuclear ser útil no diagnóstico diferencial dos desmóides e regularmente incluída no processo de diagnóstico, existem limitações definidas, como por exemplo: a variação da expressão nuclear de β -catenina, inclusive dentro da mesma amostra tumoral; a expressão da β -catenina nuclear em outras histologias, inclusive que fazem parte do diagnóstico diferencial dos tumores desmóides, como o próprio tecido cicatricial; e a expressão focal da β -catenina nuclear em alguns casos de tumores desmóides (MONTGOMERY et al. 2002; BHATTACHARYA et al. 2005; CARLSON e FLETCHER 2007; COFFIN et al. 2007). Vários trabalhos já propuseram incluir a análise mutacional da b-catenina como parte do diagnóstico (COLOMBO et al. 2011;

LE GUELLEC et al. 2012; WANG et al. 2012), entretanto é importante ressaltar que em 5-10% dos desmóides não são identificadas mutações nem no gene *CTNNB1*, nem no gene *APC*, mesmo nos casos onde o aumento da expressão nuclear de β -catenina é observada. Dessa forma, estudos que identifiquem alterações genéticas em larga escala se fazem necessários com o intuito de melhorar o conhecimento da biologia dos tumores desmóides, visando o descobrimento de novas alterações que possam ser utilizadas no diagnóstico molecular desses tumores.

Além da identificação de novos marcadores moleculares para o diagnóstico dos tumores desmóides, estudos de avaliação de mutação somática em larga escala podem auxiliar na identificação de novos parceiros de ligação ou genes alvo da β -catenina, o que pode resultar no desenvolvimento de terapia-alvo, direcionando a ação o mais exclusivamente possível às células tumorais, reduzindo assim, os efeitos colaterais do tratamento.

Com o advento das plataformas de sequenciamento de nova geração, o nível de sensibilidade para captar e caracterizar alterações presentes nos tumores atingiu um nível anteriormente inviável (KAISER 2008), o que pode levar a um melhor entendimento da desregulação da via Wnt nos tumores desmóides. Atualmente estão sendo comercializadas diferentes plataformas de sequenciamento em larga escala e um número ainda maior de programas para a análise de dados gerados por esses sequenciamentos de nova geração. O uso de diferentes programas (cada um com seu próprio algoritmo) combinado com as diferentes tecnologias comercializadas para o

sequenciamento de nova geração podem levar a erros que são característicos de cada plataforma (XUAN et al. 2013). Dessa forma, se torna crucial conhecer esses erros para que a escolha da plataforma que será utilizada esteja de acordo com o objetivo do estudo e para garantir que seja a plataforma correta para se chegar ao resultado desejado.

Um das dessas plataformas que estão sendo utilizadas para o sequenciamento de nova geração é o *SOLiD*, que segundo SASSON e MICHAEL (2010), gera dados bastante confiáveis em relação a SNPs e INDELS, com uma taxa de erro maior perto do final da região 3' (SASSON e MICHAEL 2010). XUAN et al. (2013) demonstraram que o erro mais comum dessa plataforma é o de substituição, porém esse é o sistema que apresenta a menor taxa de erro (XUAN et al. 2013) e, portanto, foi a plataforma escolhida, uma vez que era a plataforma disponível no nosso laboratório para esse estudo que visa identificar e caracterizar as alterações moleculares dos tumores desmóides.

Em nosso estudo, nós utilizamos sequenciamento completo do exoma para identificar novos genes que possam estar associados à tumorigênese dos tumores desmóides. Devido à variedade de aberrações genéticas complexas encontrada nos tumores, nem sempre é possível contar com sequências humanas de referência padrão (STRATTON et al. 2009; ULAHANNAN et al. 2013). Assim, nós optamos por utilizar na nossa análise amostras de sangue periférico de cada paciente incluído nesse estudo com o intuito de filtrar as variantes que possivelmente sejam só características pessoais e que, portanto, provavelmente não estão associadas à

tumorigênese dos tumores desmóides, caracterizando as mutações somáticas reais. Após sequenciamento do exoma, os dados gerados pelo sequenciamento foram alinhados ao genoma humano de referência e para a chamada das variantes foi utilizado o programa Bioscope e SHRiMP para fazer a chamada das SNVs (variações de nucleotídeos) e INDELs (inserções e deleções), respectivamente. Após a chamada de variantes, foram utilizados critérios onde ficaram apenas as variantes presentes nas regiões codificadoras e em sítio de splice e que apresentassem uma cobertura mínima de 10 *reads* e a frequência da base variante em no mínimo 10% das sequências.

A princípio, nós buscamos as variantes somáticas (SNVs e Indels) nas 3.445 alterações identificadas pela chamada de variantes. Após a utilização de filtros controles para a seleção de variantes mais robustas, nós identificamos 207 SNVs e 35 INDELs (Anexo 3). Com intuito de tentar escolher as sequências que se encontravam boas e que, dessa forma, teriam uma chance maior de reportar alterações verdadeiras e não somente artefatos, uma análise visual no programa *CLC Genomics Workbench* foi feita. Após essa análise, nós identificamos 49 alterações que pareciam promissoras. Ao analisarmos os dados obtidos, identificamos um alto número de alterações que se apresentavam com baixa frequência da variante alterada. Para se ter um melhor entendimento e certeza que o sequenciamento automático (Sanger) seria sensível suficiente para detectar as mutações encontradas pelo sequenciamento em larga escala, a validação por Sanger seria feita primeiro, como um teste, em 4 alterações somente,

uma vez que a sensibilidade do Sanger não é tão alta. O sequenciamento por Sanger validou somente 1 alteração dentre as 4 escolhidas, porém a frequência da variante alterada era alta (41%). Além disso, o sequenciamento automático não foi capaz de validar nenhuma das mutações identificadas no gene *CTNNB1*. Por ser tratar de uma mutação já muito bem caracterizada e típica dos tumores desmóides (p.S45F), acreditamos que essas alterações são verdadeiras, entretanto o sequenciamento por Sanger não foi suficientemente sensível para identificar essa mutação. Além disso, os resultados recentemente publicados por AITKEN et al. (2015) corroboram a hipótese de que as alterações são verdadeiras. Os resultados do grupo acima mostraram que o sequenciamento de nova geração através do *Ion PGM System* identificou 8 mutações no gene *CTNNB1* que não foram possíveis de serem detectadas pelo método utilizado pelos autores (PCR associada à digestão por uma enzima de restrição específica), sendo que dentre essas 8 mutações, 5 (62.5%) eram do tipo p.S45F. Dessa forma, optamos por validar todas as alterações escolhidas por sequenciamento alvo (*targeted sequencing*) através do Ion AmpliSeq e sequenciamento na plataforma Ion PGM por ser um método mais sensível. Entretanto, como LOMAN (2012) 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, no momento do estudo, quando ainda o grupo estava estabelecendo os critérios para seleção e validação das variantes, optamos por validar somente as alterações do tipo SNVs.

Após avaliar todas as variações através do programa *CLC Genomics Workbench (CLCbio)* para confirmar que só estavam presente nas amostras tumorais, selecionamos 33 genes para validação, das quais 30 reportam substituições de uma base que levam a uma troca de aminoácido e 3 reportam a substituições de uma base que gera um codon de parada prematura. Das 49 alterações escolhidas, 15 (30.6%) alterações foram validadas pelo Ion PGM. Dentre os 13 genes onde identificamos mutações, 8 já foram observados alterados em câncer. Entretanto, com exceção da mutação em β -catenina (p.S45F), nenhuma outra mutação está descrita na literatura.

Uma das alterações validadas foi a mutação c.4609A>T do gene *ABCC2*, que codifica uma proteína chamada de proteína de resistência a múltiplas drogas 2 (MRP2). Esta proteína está envolvida no transporte de substâncias para fora das células e já foi associada à resistência a múltiplas drogas (TONIGOLD et al. 2014; VASILYEVA et al. 2015). Além disso, foi mostrado que uma alta expressão do gene *ABCC2* junto com a baixa expressão do gene *ABCG2* são eventos precoces na sequência adenoma-carcinoma colorretal (ANDERSEN et al. 2015).

Outro gene validado como mutado nas nossas amostras (c.6748C>T) que também foi observado no câncer de colorretal foi o gene *ANKRD17*. Este gene codifica uma proteína com repetições de anquirina, que estão associadas com as interações proteína-proteína. IOANA et al. (2010), mostraram que o câncer de colorretal apresenta uma baixa expressão do

mRNA de *ANKRD17* quando comparado com amostras normais (IOANA et al. 2010).

A mutação do gene *CADPS* (c.2359C>T) também foi validada pelo Ion PGM em uma amostra de tumor desmóide esporádico. Esse gene codifica uma proteína que atua tanto no citosol como na membrana, necessária para exocitose regulada por Ca^{2+} das vesículas secretoras. Dois trabalhos já indicaram que a perda da expressão desse gene parece ser um indicador de pior prognóstico (MILLER et al. 2011; HAIDER et al. 2014).

O gene *ARHGAP32* codifica a proteína RICS, que atua na modulação de Rho GTPase. A mutação validada foi a c.44T>A. SCHULTE et al. (2012) encontraram esse gene fusionado com o gene *TAOK1* em uma linhagem celular de câncer de mama.

De todas as mutações validadas, o gene *ITGB1* é o mais estudado. Segundo o *polyphen*, a mutação (c.463A>G) somática encontrada em um tumor desmóide é patogênica. *ITGB1* é uma integrina do tipo β . As integrinas são proteínas heterodiméricas constituídas por subunidades alfa e beta. Membros da família das integrinas são receptores de membrana envolvidos na adesão celular e reconhecimento de uma variedade de processos, incluindo embriogênese, homeostasia, reparação de tecidos, a resposta imune e difusão metastática de células tumorais. Existem vários trabalhos que mostraram que *ITGB1* está regulada positivamente em diversos tipos tumorais e está associada a diversos processos, como progressão tumoral e metástases, dentre eles o câncer colorretal e o câncer de ovário (YANG et al. 2014; YE et al. 2014; SONG et al. 2014, 2015; ZHOU et al. 2015a).

Outra mutação validada através do Ion PGM foi no gene *SI*, que codifica uma enzima sacarase-isomaltase, que é expressa no intestino. A proteína codificada é sintetizada como uma proteína precursora que é clivada por proteases pancreáticas em duas subunidades enzimáticas: a sucrase e a isomaltase. Estas duas subunidades se heterodimerizam para formar o complexo de sacarose-isomaltase. RODRÍGUEZ et al. (2013), identificaram através do sequenciamento de nova geração esse gene como um dos genes mais frequentemente mutados em uma coorte de 105 pacientes com leucemia linfóide crônica.

O gene *PNN*, que codifica uma proteína associada ao desmossomo, também apresentou uma mutação validada (c.2067G>T). A super expressão desse gene já foi relacionada com câncer de pulmão de não pequenas células. De todos os genes novos identificados como mutados nos tumores desmóides, esse é o único no qual já foi identificada uma ligação com a via Wnt/ β -catenina. JOO et al. (2007) mostraram que esse gene afeta a via Wnt, provavelmente através do seu envolvimento com a atividade do TCF/LEF. Além disso, foi demonstrado que em células deficientes em PNN a atividade do repórter do TCF/LEF apresentava-se regulada positivamente, assim como foi observado uma expressão e distribuição desregulada de β -catenina e Tcf4 (JOO et al. 2010).

A mutação c.2200A>G do gene *TPP2* também foi validada. Esse gene codifica uma peptidase. Sua super-expressão foi relacionada à progressão dos carcinomas de células escamosas da cavidade oral (USUKURA et al. 2013).

Além dessas mutações desconhecidas, a mutação do gene *CTNNB1* (p.S45F) também foi validada em 3 pacientes com tumores desmóides esporádicos que o sequenciamento automático por Sanger tinha mostrado que possuíam o gene *CTNNB1* selvagem. De todas as mutações validadas, consideramos essa como a mais importante e interessante, apesar de já estar muito bem caracterizada na literatura. Esse resultado enfatiza mais uma vez a importância da via Wnt e principalmente da proteína β -catenina na tumorigênese dos tumores desmóides, corroborando assim, com a teoria de que os tumores desmóides sofrem do efeito conhecido como “*oncogene addiction*”. Segundo essa teoria, alguns tumores aparentemente são dependentes de um ou alguns genes para manter seu fenótipo maligno (WEINSTEIN e JOE 2008).

Esse é um dado extremamente importante no histórico da mutação de *CTNNB1* nos tumores desmóides. Os primeiros trabalhos que identificaram a mutação de *CTNNB1* nos tumores desmóides reportavam uma frequência de mutação que variava entre 30-50% (MIYOSHI et al. 1998; TEJPAR et al. 1999). Com o passar dos anos, e, conseqüentemente, com o desenvolvimento de técnicas capazes de aumentar a sensibilidade das técnicas de sequenciamento, a frequência de mutação de *CTNNB1* nos tumores desmóides começou a ser reportada em aproximadamente 85% dos casos (LAZAR et al. 2008; COLOMBO et al. 2011). Entretanto, nossos dados mostram que quanto maior a sensibilidade do método utilizado para o sequenciamento, maior a frequência de mutações encontradas no gene *CTNNB1*, o que indica que, na verdade, a maioria dos tumores desmóides

esporádicos, considerados posteriormente como selvagens para os genes *CTNNB1* e *APC*, muito provavelmente possuem mutações no gene *CTNNB1*, porém em uma frequência tão baixa que é preciso utilizar métodos mais sensíveis para se identificar essa mutação.

Além de serem importantes para o conhecimento da biologia tumoral dos desmóides, nossos resultados também são muito importantes na parte clínica, uma vez que diversos estudos associaram a mutação no códon 45 do gene *CTNNB1* (p.S45F) com um risco significativamente maior de recidiva (LAZAR et al. 2008; BO et al. 2012; COLOMBO et al. 2013; VAN BROEKHOVEN et al. 2015). Além disso, a mutação p.S45F também se mostrou como um marcador de prognóstico, uma vez que os pacientes portadores dessa mutação apresentaram uma significativa resposta pior ao tratamento com meloxicam (HAMADA et al. 2014). Curiosamente, os desmóides que até então eram considerados selvagens para o gene *CTNNB1*, são normalmente relacionados a um melhor prognóstico (LAZAR et al. 2008; COLOMBO et al. 2013). Entretanto, nossos resultados mostram que esses tumores, na maioria das vezes, apresentam a mutação p.S45F, só que em baixa frequência. Esse dado conflitante é de extrema importância, pois sugere que a frequência de variantes mutadas é um melhor marcador de prognóstico do que somente a presença ou não dessa mutação.

Uma vez que esse dado sobre a mutação p.S45F nos tumores desmóides que anteriormente eram considerados selvagens para o gene *CTNNB1* é muito recente, o acompanhamento desses pacientes se torna de extrema importância para se entender se a baixa frequência dessa variante

mutada realmente resulta em um tumor menos agressivo ou ainda assim resulta em um tumor agressivo, porém tardiamente.

Pacientes portadores de tumores desmóides com a mutação p.S45F, por serem mais agressivos, normalmente são observados com uma frequência e cuidado maior. Entretanto, no caso da nossa casuística, esses 3 pacientes que foram sequenciados através do sequenciamento automático por Sanger, seriam considerados como selvagens para β -catenina e não tirariam vantagem dessa observação mais cuidadosa. Além disso, essa informação sobre a mutação seria de extrema importância para o oncologista clínico na hora de decidir qual linhagem de tratamento seguir com esse paciente, uma vez que essa mutação parece ser um marcador de pior prognóstico.

Até o momento, o sequenciamento automático por Sanger é o padrão-ouro para a análise mutacional do gene *CTNNB1*, entretanto nossos resultados mostraram que esse tipo de estratégia não é a melhor para sequenciar o gene *CTNNB1* nos tumores desmóides, pois não é capaz de identificar as mutações com frequência menor do que 15% da variante mutada. De 7 pacientes com tumores esporádicos, o sequenciamento automático não foi capaz de identificar a mutação de β -catenina em 3 (42.9%) pacientes. É preocupante pensar em quantos desses pacientes estão sendo considerados selvagens para β -catenina, quando na verdade são mutados.

O sequenciamento automático apresentou uma especificidade de 100%, entretanto a sensibilidade foi de 57.1%. Já o sequenciamento alvo

utilizando a plataforma Ion PGM apresentou uma sensibilidade e especificidade de 100%. AITKEN et al. (2015) observaram uma frequência de 92.36% de sensibilidade e 100% de especificidade para o sequenciamento de nova geração feito utilizando o Ion PGM. Já a metodologia de PCR associada à digestão por uma enzima de restrição específica mostrou ter uma sensibilidade de 82.41%.

Além de ser mais sensível do que o sequenciamento automático, o sequenciamento de nova geração é mais eficiente do que as metodologias que estão sendo utilizadas no momento para detecção da mutação do gene *CTNNB1*, uma vez que permite o rastreamento de várias alterações em um único ensaio e o custo-benefício é comparável ao de outras metodologias, como o sequenciamento automático por Sanger. Dessa forma, nossos resultados indicam que o sequenciamento alvo deveria ser incorporado na prática clínica como padrão ouro de análise mutacional do gene *CTNNB1*, pelo menos nos casos dos pacientes com tumores desmóides.

6 CONCLUSÕES

Com o presente trabalho, podemos concluir que:

- 1 O sequenciamento pelo método de Sanger não é suficientemente sensível para ser utilizado na validação da mutação do gene *CTNNB1* encontrada em baixa frequência através dos métodos de sequenciamento de nova geração. Mesmo nos casos onde não foi possível detectar mutação do gene *CTNNB1* pelo sequenciamento (método Sanger), o sequenciamento do exoma mostrou que a mutação neste gene está presente em uma frequência mais baixa e, por isso, só sendo detectado por métodos mais sensíveis, corroborando a hipótese de que os tumores desmóides são dependentes da via WNT/ β -catenina.
- 2 As mutações somáticas nos genes *ABCC2* (c.4609A>T), *SLCO1C1* (c.1609A>G), *TTC37* (c.3691A>G), *CTNNB1* (c.134C>T), *ANKRD17* (c.6748C>T), *CADPS* (c.2359C>T), *DCAF4L1* (c.130C>T), *LARGE* (c.1277A>C), *ARHGAP32* (c.44T>A), *ITGB1* (c.463A>G), *PNN* (c.2067G>T), *SI* (c.4503C>A) e *TPP2* (c.2200A>G) foram identificadas nos tumores desmóides analisados nesse trabalho, a maioria delas pela primeira vez.
- 3 A análise mutacional de β -catenina deveria ser incluída como parte do processo de diagnóstico dos tumores desmóides e o

sequenciamento alvo por NGS deveria ser a metodologia padrão para essas análises, uma vez que nossos resultados mostram que o sequenciamento alvo apresentou uma sensibilidade de 100% na detecção de mutações no gene *CTNNB1*, contra 57.1% do sequenciamento automático do tipo Sanger.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abecasis GR, Auton A, Brooks LD, et al. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. **Nature** 2012; 491:56-65.

Aitken SJ, Presneau N, Kalimuthu S, et al. Next-generation sequencing is highly sensitive for the detection of beta-catenin mutations in desmoid-type fibromatoses. **Virchows Arch** 2015; Apr 3. [Epub ahead of print].

Alman BA, Pajerski ME, Diaz-Cano S, Corboy K, Wolfe HJ. Aggressive fibromatosis (desmoid tumor) is a monoclonal disorder. **Diagn Mol Pathol** 1997; 6:98-101.

Amary MFC, Pauwels P, Meulemans E, et al. Detection of beta-catenin mutations in paraffin-embedded sporadic desmoid-type fibromatosis by mutation-specific restriction enzyme digestion (MSRED): an ancillary diagnostic tool. **Am J Surg Pathol** 2007; 31:1299-309.

Andersen V, Vogel LK, Kopp TI, et al. High ABCC2 and low ABCG2 gene expression are early events in the colorectal adenoma-carcinoma sequence. **PLoS One** 2015; 10:e0119255.

Aoki M, Hecht A, Kruse U, Kemler R, Vogt PK. Nuclear endpoint of Wnt signaling: neoplastic transformation induced by transactivating lymphoid-enhancing factor 1. **Proc Natl Acad Sci USA** 1999; 96:139-44.

Barker N. The canonical Wnt/beta-catenin signalling pathway. **Methods Mol. Biol** 2008; 468:5-15.

Berri RN, Baumann DP, Madewell JE, Lazar A, Pollock RE. Desmoid tumor: current multidisciplinary approaches. **Ann Plast Surg** 2011; 67:551-64.

Bertario L, Russo A, Sala P, et al. Genotype and phenotype factors as determinants of desmoid tumors in patients with familial adenomatous polyposis. **Int. J Cancer** 2001; 95:102-7.

Bertario L, Russo A, Sala P, et al. Multiple approach to the exploration of genotype-phenotype correlations in familial adenomatous polyposis. **J Clin Oncol** 2003; 21:1698-707.

Bhattacharya B, Dilworth HP, Iacobuzio-Donahue C, et al. Nuclear beta-catenin expression distinguishes deep fibromatosis from other benign and malignant fibroblastic and myofibroblastic lesions. **Am J Surg Pathol** 2005; 29:653-9.

Bienz M, Clevers H. Linking Colorectal Cancer to Wnt Signaling. **Cell** 2000; 103:311-320.

Bn A, Cd JK, Ps S, M M, Urs R. Giant aggressive mesenteric fibromatosis- a case report. **J Clin Diagn Res** 2015; 9:PD07-8.

Bo N, Wang D, Wu B, Chen L, Ruixue Ma. Analysis of β -catenin expression and exon 3 mutations in pediatric sporadic aggressive fibromatosis. **Pediatr Dev Pathol** 2012; 15:173-8.

Bonvalot S, Eldweny H, Haddad V, et al. Extra-abdominal primary fibromatosis: Aggressive management could be avoided in a subgroup of patients. **Eur J Surg Oncol** 2008; 34:462-8.

Briand S, Barbier O, Biau D, et al. Wait-and-see policy as a first-line management for extra-abdominal desmoid tumors. **J Bone Joint Surg Am** 2014; 96:631-8.

Bridge JA, Sreekantaiah C, Mouron B, Neff JR, Sandberg AA, Wolman SR. Clonal chromosomal abnormalities in desmoid tumors. Implications for histopathogenesis. **Cancer** 1992; 69:430-6.

Burt RW, Bishop DT, Lynch HT, Rozen P, Winawer SJ. Risk and surveillance of individuals with heritable factors for colorectal cancer. WHO Collaborating Centre for the Prevention of Colorectal Cancer. **Bull World Health Organ** 1990; 68:655-65.

Carlson JW, Fletcher CDM. Immunohistochemistry for beta-catenin in the differential diagnosis of spindle cell lesions: analysis of a series and review of the literature. **Histopathology** 2007; 51:509-14.

Caspari R, Olschwang S, Friedl W, et al. Familial adenomatous polyposis: desmoid tumours and lack of ophthalmic lesions (CHRPE) associated with APC mutations beyond codon 1444. **Hum Mol Genet** 1995; 4:337-40.

Chandrani P, Kulkarni V, Iyer P, et al. NGS-based approach to determine the presence of HPV and their sites of integration in human cancer genome. **Br J Cancer** 2015;

Cheon SS, Cheah AYL, Turley S, et al. beta-Catenin stabilization dysregulates mesenchymal cell proliferation, motility, and invasiveness and causes aggressive fibromatosis and hyperplastic cutaneous wounds. **Proc Natl Acad Sci USA**. 2002; 99:6973-8.

Clevers H, Nusse R. Wnt/ β -catenin signaling and disease. **Cell** 2012; 149:1192-205.

Coffin CM, Hornick JL, Zhou H, Fletcher CDM. Gardner fibroma: a clinicopathologic and immunohistochemical analysis of 45 patients with 57 fibromas. **Am J Surg Pathol** 2007; 31:410-6.

Cohen AW, Carbajal JM, Schaeffer RC Jr. VEGF stimulates tyrosine phosphorylation of beta-catenin and small-pore endothelial barrier dysfunction. **Am J Physiol** 1999 ; 277:2038-49.

Colombo C, Bolshakov S, Hajibashi S, et al. "Difficult to diagnose" desmoid tumours: a potential role for CTNNB1 mutational analysis. **Histopathology** 2011; 59:336-40.

Colombo C, Miceli R, Lazar AJ, et al. CTNNB1 45F mutation is a molecular prognosticator of increased postoperative primary desmoid tumor recurrence: An independent, multicenter validation study. **Cancer** 2013; 119:3696-702.

Courey AJ, Jia S. Transcriptional repression: the long and the short of it. **Genes Dev** 2001; 15:2786-96.

Couture J, Mitri A, Lagace R, et al. A germline mutation at the extreme 3' end of the APC gene results in a severe desmoid phenotype and is associated with overexpression of beta-catenin in the desmoid tumor. **Clin Genet** 2000; 57:205-12.

Daniels DL, Weis WI. Beta-catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from Tcf/Lef in Wnt-mediated transcription activation. **Nat Struct Mol Biol** 2005; 12:364-71.

De Bree E, Keus R, Melissas J, Tsiftsis D, Van Coevorden F. Desmoid tumors: need for an individualized approach. **Expert Rev Anticancer Ther** 2009; 9:525-35.

De Bree E, Zoetmulder FAN, Keus RB, Peterse HL, Van Coevorden F. Incidence and treatment of recurrent plantar fibromatosis by surgery and postoperative radiotherapy. **Am J Surg** 2004; 187:33-8.

De Wever I, Dal Cin P, Fletcher CD, et al. Cytogenetic, clinical, and morphologic correlations in 78 cases of fibromatosis: a report from the CHAMP Study Group. *CHromosomes And Morphology*. **Mod Pathol** 2000; 13:1080-5.

Den Dunnen JT, Antonarakis SE. Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. **Hum Mutat** 2000; 15:7-12.

Deyrup AT, Tretiakova M, Montag AG. Estrogen receptor-beta expression in extraabdominal fibromatoses: an analysis of 40 cases. **Cancer** 2006; 106:208-13.

Duncavage EJ, Tandon B. The utility of next-generation sequencing in diagnosis and monitoring of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. **Int J Lab Hematol** 2015; 37 Suppl 1:115-21.

Endo T, Endo S, Yamamoto S, Tetsuka K. Intrathoracic desmoid tumor arising at a distance from thoracotomy sites after thoracoscopic segmentectomy: report of a case. **J Thorac Dis** 2015; 7:E81-4.

Fiore M, Rimareix F, Mariani L, et al. Desmoid-type fibromatosis: a front-line conservative approach to select patients for surgical treatment. **Ann Surg Oncol** 2009; 16:2587-93.

Fleetwood VA, Zielsdorf S, Eswaran S, Jakate S, Chan EY. Intra-abdominal desmoid tumor after liver transplantation: A case report. **World J Transplant** 2014; 4:148-52.

Fletcher JA, Naeem R, Xiao S, Corson JM. Chromosome aberrations in desmoid tumors. Trisomy 8 may be a predictor of recurrence. **Cancer Genet Cytogenet** 1995; 79:139-43.

Fong Y, Rosen PP, Brennan MF. Multifocal desmoids. **Surgery** 1993; 114:902-6.

Giarola M, Wells D, Mondini P, et al. Mutations of adenomatous polyposis coli (APC) gene are uncommon in sporadic desmoid tumours. **Br J Cancer** 1998; 78:582-7.

Gleeson FC, Kipp BR, Voss JS, et al. Endoscopic ultrasound fine-needle aspiration cytology mutation profiling using targeted next-generation sequencing: personalized care for rectal cancer. **Am J Clin Pathol** 2015; 143:879-88.

Goss KH, Groden J. Biology of the adenomatous polyposis coli tumor suppressor. **J Clin Oncol** 2000; 18:1967-79.

Gottardi CJ, Gumbiner BM. Distinct molecular forms of beta-catenin are targeted to adhesive or transcriptional complexes. **J. Cell Biol** 2004; 167:339-49.

Gounder MM, Lefkowitz RA, Keohan ML, et al. Activity of Sorafenib against desmoid tumor/deep fibromatosis. **Clin Cancer Res** 2011; 17:4082-90.

Groen EJ, Roos A, Muntinghe FL, et al. Extra-intestinal manifestations of familial adenomatous polyposis. **Ann Surg Oncol** 2008; 15:2439-50.

Gronchi A, Casali PG, Mariani L, et al. Quality of surgery and outcome in extra-abdominal aggressive fibromatosis: a series of patients surgically treated at a single institution. **J Clin Oncol** 2003; 21:1390-7.

Gurbuz AK, Giardiello FM, Petersen GM, et al. Desmoid tumours in familial adenomatous polyposis. **Gut** 1994; 35:377-81.

Haider S, Wang J, Nagano A, et al. A multi-gene signature predicts outcome in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. **Genome Med** 2014; 6:105.

Hamada S, Futamura N, Ikuta K, et al. CTNNB1 S45F mutation predicts poor efficacy of meloxicam treatment for desmoid tumors: a pilot study. **PLoS One** 2014; 9:e96391.

Hecht A, Litterst CM, Huber O, Kemler R. Functional characterization of multiple transactivating elements in beta-catenin, some of which interact with the TATA-binding protein in vitro. **J. Biol. Chem** 1999; 274:18017-25.

Hechtman JF, Liu W, Sadowska J, et al. Sequencing of 279 cancer genes in ampullary carcinoma reveals trends relating to histologic subtypes and frequent amplification and overexpression of ERBB2 (HER2). **Mod Pathol** 2015; May 15. [Epub ahead of print]

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

Horii A, Nakatsuru S, Ichii S, Nagase H, Nakamura Y. Multiple forms of the APC gene transcripts and their tissue-specific expression. **Hum. Mol. Genet** 1993; 2:283-7.

Ikenoue T, Yamaguchi K, Komura M, et al. Attenuated familial adenomatous polyposis with desmoids caused by an APC mutation. **Hum Genome Var** 2015; 2:15011.

Ioana M, Angelescu C, Burada F, et al. MMR gene expression pattern in sporadic colorectal cancer. **J Gastrointest Liver Dis** 2010; 19:155-9.

Janinis J, Patriki M, Vini L, Aravantinos G, Whelan JS. The pharmacological treatment of aggressive fibromatosis: a systematic review. **Ann Oncol** 2003; 14:181-90.

Joo J-H, Lee YJ, Munguba GC, et al. Role of Pinin in neural crest, dorsal dermis, and axial skeleton development and its involvement in the regulation of Tcf/Lef activity in mice. **Dev Dyn** 2007; 236:2147-58.

Joo J-H, Taxter TJ, Munguba GC, et al. Pinin modulates expression of an intestinal homeobox gene, Cdx2, and plays an essential role for small intestinal morphogenesis. **Dev Biol** 2010; 345:191-203.

Kaiser J. DNA sequencing. A plan to capture human diversity in 1000 genomes. **Science** 2008; 319:395.

Kasper B, Ströbel P, Hohenberger P. Desmoid tumors: clinical features and treatment options for advanced disease. **Oncologist** 2011; 16:682-93.

Kikuchi A. Tumor formation by genetic mutations in the components of the Wnt signaling pathway. **Cancer Sci** 2003; 94:225-9.

Kikuchi A, Yamamoto H, Kishida S. Multiplicity of the interactions of Wnt proteins and their receptors. **Cell Signal** 2007; 19:659-71.

Kim P-S, Han D-S, Han H-S, Bang HY. Intra-abdominal fibromatosis after gastrectomy for gastric cancer. **Ann Surg Treat Res** 2014; 87:331-5.

Kishida S, Yamamoto H, Ikeda S, et al. Axin, a negative regulator of the wnt signaling pathway, directly interacts with adenomatous polyposis coli and regulates the stabilization of beta-catenin. **J Biol Chem** 1998; 273:10823-6.

Kosaki R, Takenouchi T, Takeda N, et al. Somatic CTNNB1 mutation in hepatoblastoma from a patient with Simpson-Golabi-Behmel syndrome and germline GPC3 mutation. **Am J Med Genet A** 2014; 164A:993-7.

Kraus C, Liehr T, Hülsken J, et al. Localization of the human beta-catenin gene (CTNNB1) to 3p21: a region implicated in tumor development. **Genomics** 1994; 23:272-4.

Latchford AR, Sturt NJH, Neale K, Rogers PA, Phillips RKS. A 10-year review of surgery for desmoid disease associated with familial adenomatous polyposis. **Br. J Surg** 2006; 93:1258-64.

Lazar AJF, Tuvin D, Hajibashi S, et al. Specific Mutations in the β -Catenin Gene (CTNNB1) Correlate with Local Recurrence in Sporadic Desmoid Tumors. **Am J Pathol** 2008; 173:1518-1527.

Le Guellec S, Soubeyran I, Rochaix P, et al. CTNNB1 mutation analysis is a useful tool for the diagnosis of desmoid tumors: a study of 260 desmoid tumors and 191 potential morphologic mimics. **Mod Pathol** 2012; 25:1551-8.

Lee JC, Thomas JM, Phillips S, Fisher C, Moskovic E. Aggressive fibromatosis: MRI features with pathologic correlation. **AJR Am J Roentgenol** 2006; 186:247-54.

Lefevre JH, Parc Y, Kernéis S, et al. Risk factors for development of desmoid tumours in familial adenomatous polyposis. **Br J Surg** 2008; 95:1136-9.

Leoz ML, Carballal S, Moreira L, Ocaña T, Balaguer F. The genetic basis of familial adenomatous polyposis and its implications for clinical practice and risk management. **Appl Clin Genet** 2015; 8:95-107.

Lepourcelet M, Chen Y-NP, France DS, et al. Small-molecule antagonists of the oncogenic Tcf/ β -catenin protein complex. **Cancer Cell** 2004; 5:91-102.

Leppert M, Dobbs M, Scambler P, et al. The gene for familial polyposis coli maps to the long arm of chromosome 5. **Science** 1987; 238:1411-3.

Li C, Bapat B, Alman BA. Adenomatous polyposis coli gene mutation alters proliferation through its beta-catenin-regulatory function in aggressive fibromatosis (desmoid tumor). **Am J Pathol** 1998; 153:709-14.

Li C-M, Kim CE, Margolin AA, et al. CTNNB1 mutations and overexpression of Wnt/beta-catenin target genes in WT1-mutant Wilms' tumors. **Am J Pathol** 2004; 165:1943-53.

Li Destri G, Ferraro MJ, Calabrini M, Pennisi M, Magro G. Desmoid-type fibromatosis of the mesentery: report of a sporadic case with emphasis on differential diagnostic problems. **Case Rep Med** 2014; 2014:850180.

Li M, Cordon-Cardo C, Gerald WL, Rosai J. Desmoid fibromatosis is a clonal process. **Hum Pathol** 1996; 27:939-943.

Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. **Annu Rev Cell Dev Biol** 2004; 20:781-810.

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

Maes C, Goossens S, Bartunkova S, et al. Increased skeletal VEGF enhances beta-catenin activity and results in excessively ossified bones. **EMBO J** 2010 ;29:424-41.

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

Melis M, Zager JS, Sondak VK. Multimodality management of desmoid tumors: how important is a negative surgical margin? **J Surg Oncol** 2008; 98:594-602.

Mendenhall WM, Zlotecki RA, Morris CG, Hochwald SN, Scarborough MT. Aggressive fibromatosis. **Am J Clin Oncol** 2005; 28:211-5.

Michopoulou A, Germanos S, Kanakopoulos D, et al. Management of a large abdominal wall desmoid tumor during pregnancy. Case report. **Ann Ital Chir** 2010; 81:153-6.

Miller S, Rogers HA, Lyon P, et al. Genome-wide molecular characterization of central nervous system primitive neuroectodermal tumor and pineoblastoma. **Neuro Oncol** 2011; 13:866-79.

Mirabelli-Primdahl L, Gryfe R, Kim H, et al. {beta}-Catenin Mutations Are Specific for Colorectal Carcinomas with Microsatellite Instability but Occur in Endometrial Carcinomas Irrespective of Mutator Pathway. **Cancer Res** 1999; 59:3346-3351.

Miyaki M, Yamaguchi T, Iijima T, et al. Difference in characteristics of APC mutations between colonic and extracolonic tumors of FAP patients: variations with phenotype. **Int J Cancer** 2008; 122:2491-7.

Miyoshi Y, Iwao K, Nawa G, Yoshikawa H, Ochi T, Nakamura Y. Frequent mutations in the beta-catenin gene in desmoid tumors from patients without familial adenomatous polyposis. **Oncol Res** 1998; 10:591-4.

Miyoshi Y, Nagase H, Ando H, et al. Somatic mutations of the APC gene in colorectal tumors: mutation cluster region in the APC gene. **Hum Mol Genet** 1992; 1:229-33.

Montgomery E, Torbenson MS, Kaushal M, Fisher C, Abraham SC. Beta-catenin immunohistochemistry separates mesenteric fibromatosis from gastrointestinal stromal tumor and sclerosing mesenteritis. **Am J Surg Pathol** 2002; 26:1296-301.

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

Morin PJ, Weeraratna AT. The APC tumor suppressor pathway. **Methods Mol Biol** 2003; 222:21-40.

Morozova O, Marra MA. From cytogenetics to next-generation sequencing technologies: advances in the detection of genome rearrangements in tumors. **Biochem Cell Biol** 2008; 86:81-91.

Mullen JT, DeLaney TF, Rosenberg AE, et al. β -Catenin mutation status and outcomes in sporadic desmoid tumors. **Oncologist** 2013; 18:1043-9.

Munemitsu S, Souza B, Müller O, Albert I, Rubinfeld B, Polakis P. The APC gene product associates with microtubules in vivo and promotes their assembly in vitro. **Cancer Res** 1994; 54:3676-81.

Nakayama T, Tsuboyama T, Toguchida J, Hosaka T, Nakamura T. Natural course of desmoid-type fibromatosis. **J Orthop Sci** 2008; 13:51-5.

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.

Ng TL, Gown AM, Barry TS, et al. Nuclear beta-catenin in mesenchymal tumors. **Mod Pathol** 2005; 18:68-74.

Nieuwenhuis MH, Casparie M, Mathus-Vliegen LMH, Dekkers OM, Hogendoorn PCW, Vasen HFA. A nation-wide study comparing sporadic and familial adenomatous polyposis-related desmoid-type fibromatoses. **Int J Cancer** 2011a; 129:256-61.

Nieuwenhuis MH, Lefevre JH, Bülow S, et al. Family history, surgery, and APC mutation are risk factors for desmoid tumors in familial adenomatous polyposis: an international cohort study. **Dis Colon Rectum** 2011b; 54:1229-34.

Nuyttens JJ, Rust PF, Thomas CR, Turrisi AT. Surgery versus radiation therapy for patients with aggressive fibromatosis or desmoid tumors: A comparative review of 22 articles. **Cancer** 2000; 88:1517-23.

Ohashi T, Shigematsu N, Kameyama K, Kubo A. Tamoxifen for recurrent desmoid tumor of the chest wall. **Int J Clin Oncol** 2006; 11:150-2.

Paik PK, Shen R, Won H, et al. Next generation sequencing of stage IV squamous cell lung cancers reveals an association of PI3K aberrations and evidence of clonal heterogeneity in patients with brain metastases. **Cancer Discov** 2015; Apr 30. [Epub ahead of print]

Pan K-F, Liu W-G, Zhang L, You W-C, Lu Y-Y. Mutations in components of the Wnt signaling pathway in gastric cancer. **World J Gastroenterol** 2008; 14:1570-4.

Papagelopoulos PJ, Mavrogenis AF, Mitsiokapa EA, Papaparaskeva KT, Galanis EC, Soucacos PN. Current trends in the management of extra-abdominal desmoid tumours. **World J Surg Oncol** 2006; 4:21.

Peng PD, Hyder O, Mavros MN, et al. Management and recurrence patterns of desmoids tumors: a multi-institutional analysis of 211 patients. **Ann Surg Oncol** 2012; 19:4036-42.

Pignatti G, Barbanti-Bròdano G, Ferrari D, et al. Extraabdominal desmoid tumor. A study of 83 cases. **Clin Orthop Relat Res** 2000; 207-13.

Plaza MJ, Yepes M. Breast fibromatosis response to tamoxifen: dynamic MRI findings and review of the current treatment options. **J Radiol Case Rep** 2012; 6:16-23.

Polakis P. Wnt signaling and cancer Wnt signaling and cancer. **Genes Dev** 2000a; 18:37-51.

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

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

Pollock PM, Hayward N. Mutations in exon 3 of the beta-catenin gene are rare in melanoma cell lines. **Melanoma Res** 2002; 12:183-6.

Pyles RB, Santoro IM, Groden J, Parysek LM. Novel protein isoforms of the APC tumor suppressor in neural tissue. **Oncogene** 1998; 16:77-82.

Quezada-Romegialli C, Véliz D, Docmac F, Harrod C. The complete mitochondrial genome of the rocky reef fish *Cheilodactylus variegatus* Valenciennes, 1833 (Teleostei: Cheilodactylidae). **Mitochondrial DNA** 2015; 1-2.

Rajput A, Kraybill WG. Clinical trials and soft tissue sarcomas. **Surg Oncol Clin N Am** 2003; 12:485-97.

Reitamo JJ, Scheinin TM, Häyry P. The desmoid syndrome. New aspects in the cause, pathogenesis and treatment of the desmoid tumor. **Am J Surg** 1986; 151:230-7.

Robinson WA, McMillan C, Kendall A, Pearlman N. Desmoid tumors in pregnant and postpartum women. **Cancers (Basel)** 2012; 4:184-92.

Rodriguez D, Ramsay AJ, Quesada V, et al. Functional analysis of sucrase-isomaltase mutations from chronic lymphocytic leukemia patients. **Hum Mol Genet** 2013; 22:2273-2282.

Rubinfeld B, Souza B, Albert I, Munemitsu S, Polakis P. The APC protein and E-cadherin form similar but independent complexes with alpha-catenin, beta-catenin, and plakoglobin. **J Biol Chem** 1995; 270:5549-55.

Sasson A, Michael TP. Filtering error from SOLiD Output. **Bioinformatics** 2010; 26:849-50.

Schiessling S, Kihm M, Ganschow P, Kadmon G, Büchler MW, Kadmon M. Desmoid tumour biology in patients with familial adenomatous polyposis coli. **Br J Surg** 2013; 100:694-703.

Schiroso L, Pellegrino M, Tarantino P, Mauro S, Tinelli A, Greco M. A new germline stop codon mutation in exon 15 of the APC gene predisposing to familial adenomatous polyposis. **Int J Biol Markers** 2013; 28:e405-8.

Schlemmer M. Desmoid tumors and deep fibromatoses. **Hematol Oncol Clin North Am** 2005; 19:565-71, vii-viii.

Schulte I, Batty EM, Pole JCM, et al. Structural analysis of the genome of breast cancer cell line ZR-75-30 identifies twelve expressed fusion genes. **BMC Genomics** 2012; 13:719.

Shido Y, Nishida Y, Nakashima H, et al. Surgical treatment for local control of extremity and trunk desmoid tumors. **Arch Orthop Trauma Surg** 2009; 129:929-33.

Shields CJ, Winter DC, Kirwan WO, Redmond HP. Desmoid tumours. **Eur J Surg Oncol** 2001; 27:701-6.

Shim HS, Kim S-J, Kim OH, et al. Fibromatosis associated with silicone breast implant: ultrasonography and MR imaging findings. **Breast J** 2014; 20:645-9.

Shimoyama T, Hiraoka K, Shoda T, Hamada T, Fukushima N, Nagata K. Multicentric extra-abdominal desmoid tumors arising in bilateral lower limbs. **Rare Tumors** 2010; 2:e12.

Singer S, Demetri GD, Baldini EH, Fletcher CD. Management of soft-tissue sarcomas: an overview and update. **Lancet Oncol** 2000; 1:75-85.

Skapek SX, Anderson JR, Hill DA, et al. Safety and efficacy of high-dose tamoxifen and sulindac for desmoid tumor in children: results of a Children's Oncology Group (COG) phase II study. **Pediatr Blood Cancer** 2013; 60:1108-12.

Skhiri H, Zellama D, Ameer Frih M, et al. [Desmoid cervical tumour following the placing of an internal jugular catheter]. **Presse Med** 2004; 33:95-7.

Sleijfer S. Management of aggressive fibromatosis: can we unravel the maze of treatment options? **Eur J Cancer** 2009; 45:2928-9.

Song J, Zhang J, Wang J, et al. β 1 integrin modulates tumor growth and apoptosis of human colorectal cancer. **Oncol Rep** 2014; 32:302-8.

Song J, Zhang J, Wang J, Wang J, Guo X, Dong W. β 1 integrin mediates colorectal cancer cell proliferation and migration through regulation of the Hedgehog pathway. **Tumour Biol** 2015; 36:2013-21.

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.

Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA. The cancer genome. **Nature** 2009; 458:719-24.

Sturt NJH, Gallagher MC, Bassett P, et al. Evidence for genetic predisposition to desmoid tumours in familial adenomatous polyposis independent of the germline APC mutation. **Gut** 2004; 53:1832-6.

Tejpar S, Nollet F, Li C, et al. Predominance of beta-catenin mutations and beta-catenin dysregulation in sporadic aggressive fibromatosis (desmoid tumor). **Oncogene** 1999; 18:6615-20.

Tonigold M, Rossmann A, Meinold M, et al. A cisplatin-resistant head and neck cancer cell line with cytoplasmic p53(mut) exhibits ATP-binding cassette transporter upregulation and high glutathione levels. **J Cancer Res Clin Oncol** 2014; 140:1689-704.

Tornesello ML, Buonaguro L, Tatangelo F, Botti G, Izzo F, Buonaguro FM. Mutations in TP53, CTNNB1 and PIK3CA genes in hepatocellular carcinoma associated with hepatitis B and hepatitis C virus infections. **Genomics** 2013; 102:74-83.

Torrezan GT, Da Silva FCC, Krepischi ACV, Dos Santos EMM, Rossi BM, Carraro DM. A novel SYBR-based duplex qPCR for the detection of gene dosage: detection of an APC large deletion in a familial adenomatous polyposis patient with an unusual phenotype. **BMC Med Genet** 2012; 13:55.

Torrezan GT, Da Silva FCC, Santos ÉMM, et al. Mutational spectrum of the APC and MUTYH genes and genotype–phenotype correlations in Brazilian FAP, AFAP, and MAP patients. **Orphanet J Rare Dis** 2013; 8:54.

Torrezan GT, Ferreira EN, Nakahata AM, et al. Recurrent somatic mutation in DROSHA induces microRNA profile changes in Wilms tumour. **Nat Commun** 2014; 5:4039.

Ulahannan D, Kovac MB, Mulholland PJ, Cazier J-B, Tomlinson I. Technical and implementation issues in using next-generation sequencing of cancers in clinical practice. **Br J Cancer** 2013; 109:827-35.

Umar A, Boland CR, Terdiman JP, et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. **J Natl Cancer Inst** 2004; 96:261-8.

Usukura K, Kasamatsu A, Okamoto A, et al. Tripeptidyl peptidase II in human oral squamous cell carcinoma. **J Cancer Res Clin Oncol** 2013; 139:123-30.

Van Broekhoven DLM, Verhoef C, Grünhagen DJ, et al. Prognostic Value of CTNNB1 Gene Mutation in Primary Sporadic Aggressive Fibromatosis. **Ann Surg Oncol** 2015; 22:1464-70.

VASEN H, WATSON P, MECKLIN J, LYNCH H. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative Group on HNPCC☆. **Gastroenterology** 1999; 116:1453-1456.

Vasilyeva A, Durmus S, Li L, et al. Hepatocellular Shuttling and Recirculation of Sorafenib-Glucuronide is Dependent on Abcc2, Abcc3, and Oatp1a/1b. **Cancer Res** 2015;

Wang W-L, Nero C, Pappo A, Lev D, Lazar AJ, López-Terrada D. CTNNB1 genotyping and APC screening in pediatric desmoid tumors: a proposed algorithm. **Pediatr Dev Pathol** 2012; 15:361-7.

Weinstein IB, Joe A. Oncogene addiction. **Cancer Res** 2008; 68:3077-80; discussion 3080.

Wheeler DA, Srinivasan M, Egholm M, et al. The complete genome of an individual by massively parallel DNA sequencing. **Nature** 2008; 452:872-6.

Wibmer C, Leithner A, Zielonke N, Sperl M, Windhager R. Increasing incidence rates of soft tissue sarcomas? A population-based epidemiologic study and literature review. **Ann Oncol** 2010; 21:1106-11.

Willert K, Jones KA. Wnt signaling: is the party in the nucleus? **Genes Dev** 2006; 20:1394-404.

Willert K, Nusse R. Beta-catenin: a key mediator of Wnt signaling. **Curr Opin Genet Dev** 1998; 8:95-102.

Wronski M, Ziarkiewicz-Wroblewska B, Slodkowski M, Cebulski W, Gornicka B, Krasnodebski IW. Mesenteric fibromatosis with intestinal involvement mimicking a gastrointestinal stromal tumour. **Radiol Oncol** 2011; 45:59-63.

Xu W, Kimelman D. Mechanistic insights from structural studies of beta-catenin and its binding partners. **J Cell Sci** 2007; 120:3337-44.

Xuan J, Yu Y, Qing T, Guo L, Shi L. Next-generation sequencing in the clinic: promises and challenges. **Cancer Lett** 2013; 340:284-95.

Yang Z, Zhou X, Liu Y, et al. Activation of integrin β 1 mediates the increased malignant potential of ovarian cancer cells exerted by inflammatory cytokines. **Anticancer Agents Med Chem** 2014; 14:955-62.

Ye P, Li Z, Jiang H, Liu T. SNPs in microRNA-binding sites in the ITGB1 and ITGB3 3'-UTR increase colorectal cancer risk. **Cell Biochem Biophys** 2014; 70:601-7.

Zauber P, Bishop T, Taylor C, Sabbath-Solitare M, Marotta S, Tomlinson I. Colorectal tumors from APC*I1307K carriers principally harbor somatic APC mutations outside the A8 tract. **PLoS One** 2014; 9:e84498.

Zeng G, Germinaro M, Micsenyi A, et al. Aberrant Wnt/beta-catenin signaling in pancreatic adenocarcinoma. **Neoplasia** 2006; 8:279-89.

Zhou F, Huang X, Zhang Z, et al. Functional polymorphisms of ITGB1 are associated with clinical outcome of Chinese patients with resected colorectal cancer. **Cancer Chemother Pharmacol** 2015a;

Zhou Y, Zhang X, Ding R, et al. Using Next-Generation Sequencing to Identify a Mutation in Human MCSU that is Responsible for Type II Xanthinuria. **Cell Physiol Biochem** 2015b; 35:2412-21.

Anexo 1 - Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)

São Paulo, 07 de Julho de 2011.

À
Dra. Isabela Werneck da Cunha

**Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1547/11
"Caracterização Molecular dos Tumores Desmóides".**

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 28/06/2011, após analisarem as respostas aos questionamentos realizados em reunião de 10/05/2011, **aprovaram** a realização do estudo em referência, datado de 01 de Junho de 2011 (Versão 2) e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

- Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos;
- Termo de Compromisso do Pesquisador com resoluções do Conselho Nacional de Saúde;
- Termo de Dispensa do Consentimento Livre e Esclarecido;
- Declaração sobre os Dados Coletados, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração sobre Uso e Destino do Material Biológico, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração sobre a publicação dos dados de pesquisa utilizando amostras fornecidas e processadas pelo Biobanco do Hospital A.C. Camargo;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Biobanco do Hospital A.C. Camargo;
- Orçamento Financeiro detalhado;
- Declaração de Infraestrutura e Instalações do Departamento de Anatomia Patológica;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Anatomia Patológica;
- Declaração de Ciência do Laboratório de Genômica Médica e Bioinformática;
- Declaração de Ciência 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. Alexandre Sá de Andrade
2º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

1/1

PARECER CONSUBSTANCIADO

Projeto: 1547/11

Título: "Caracterização Molecular dos Tumores Desmóides".

Pesquisador Responsável: Dra. Isabela Werneck da Cunha

Co-Pesquisadores: Dra. Dirce Maria Carraro, Dr. Fernando Augusto Soares, Dr. Emmanuel Dias Neto e Dr. Ademar Lopes.

Aluna: Danielle de Almeida Braggio (Doutorado).

Patrocinador: Submetido a um Grant internacional de tumores desmóides.

Comentários gerais:

Os autores propõem avaliar 6 amostras de tumores desmóides familiares e 6 esporádicos assim como as amostras de sangue periférico dos mesmos indivíduos por análises de sequenciamento (exoma) de alta performance.

Pendências apontadas em parecer anterior:

- Propõem a validação das alterações por avaliação da expressão de proteínas por imunistoquímica (número amostral não especificado ou estimado).
- Não fica claro o objetivo em se fazer a análise dos tumores esporádicos e familiares comparados com as amostras de sangue periférico. Os objetivos devem ser esclarecidos.
- Não são apresentados os critérios de inclusão e exclusão dos pacientes do estudo. Além disso, não fica claro se esses pacientes serão investigados previamente para mutações nos genes APC e CTNNB1, o que seria bem interessante.
- Este projeto pode ter consequências importantes no aconselhamento genético e não há informações sobre a possível detecção de mutações e como esses dados poderão beneficiar as famílias.
- Os autores informam que o projeto foi submetido para financiamento em agência de fomento internacional, caso este financiamento seja concedido, este projeto terá cooperação estrangeira e com isto, deverá ser analisado também pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP.

Comentários Finais:

Trata-se de resposta as pendências apontadas em primeira análise. Os questionamentos foram todos adequadamente respondidos.

Os autores incluíram a análise de sequenciamento do gene *APC* previamente à análise global, como sugerido.

Também explicam a inclusão de casos com tumores esporádicos e familiares.

O projeto tem relevância na área e poderá trazer importantes contribuições para o entendimento dos tumores desmóides.

Devido ao fato dos pesquisadores ainda estarem aguardando o resultado final do Grant internacional, o estudo ainda não é caracterizado com cooperação estrangeira, mas se o financiamento for aprovado, o projeto deverá ser analisado pela CONEP e somente poderá ser iniciado após sua aprovação.

Parecer Final:

Projeto Aprovado.

FUNDAÇÃO ANTONIO PRUDENTE
Hospital A. C. Camargo
Comitê de Ética em Pesquisa
Dr. Alexandre Sá de Andrade
2º Vice - Coordenador

Parecer referente à Reunião do CEP de 28/06/2011.

1/1

Anexo 2 - Quadro com os *primers* desenhados para o sequenciamento dos genes *APC* e *CTNNB1*.

Gene	Exon	Primer senso (5'-3')	Primer anti-senso (5'-3')
<i>CTNNB1</i>	3	CAATCTACTAATGCTAATACTGTTTCG	TCTGACTTTCAGTAAGGCAATG
<i>APC</i>	1	CTCCACTGTTTCATCCTCTTAG	CTAAGAATACTAGCCATTGGAG
<i>APC</i>	2	GTGCGTGCTTGAGAGTGATC	CAACACCCAAATCGAGAGAAG
<i>APC</i>	3	CCTGACCCAAGTGGACTTTTC	CTTCAGAATCCCAGGAAACG
<i>APC</i>	4	CATTATTAGCACTGCACCTTAGG	CAGGCCTAAAGTTGGTAAAAC
<i>APC</i>	5	GCACCATGACTGACGATTTG3	GCAGAACAGAACAGTACCAG
<i>APC</i>	6	CCTGAGCTTTTAAGTGGTAG	CTGACAGCTAAAGTAAGGTATC
<i>APC</i>	7	CACAGTTCATGCCTTTATCAG	CTGGAAATATGCATTGAGGAC
<i>APC</i>	8	CAGACACTTCATTTGGAGTACC	GATTACAGGTGTGAGCCACTG
<i>APC</i>	9	CTGATTACTTCATCCTGGAAAG	GGCTGATATGAATTTTCTCCTC3
<i>APC</i>	10	GGTTATATTAGTGATCCCTGC	GGTGGCCTTATATCCTAATTC
<i>APC</i>	11	CTTCTTCACTGTTGGCAAGG	GTAAGATAAGCGAATGTGAAGC
<i>APC</i>	12	CCTGTTGCTTATCATTCTCACC	CACAACTGCCCTCTAAGCC
<i>APC</i>	13	CACGGCTAGCCAGAATTTTC	CTCATGGCTAAAAGAAGGCAG
<i>APC</i>	14	GGGACGGCAATAGGATAG	CCTATGGGCTACACCTCTC
<i>APC</i>	15A1	GGAGATGTGGAATACTTGG	GATGCCTTGGGACTTAAATTGTC
<i>APC</i>	15A2	GCTTGCCATCTCTTCATGTTAG	GCATTTCTCTCATCTGTCACAC
<i>APC</i>	15A3	CAGGAACTTCTTCAAAGCGAG	GATTCCTTGATTGTCTTTGCTC
<i>APC</i>	15A4	CAATACCCAGCCGACCTAG	CAATAGGCTGATCCACATGAC
<i>APC</i>	15B1	CTCTGAAGAAGAACAGCATGAAG	CTGAAGATAAACTAGAACCCTGC
<i>APC</i>	15B2	GAAAAGATTGGAAGTGGTTCAG	GCATCTGGAAGAACCCTGGAC
<i>APC</i>	15B3	CCTCCTCAAACAGCTCAAAC	GCTGACTTGGTTTCTTCTGC
<i>APC</i>	15B4	GAAACAGAATCAGAGCAGCC	CAGGTATGGTTACAGATGAGG
<i>APC</i>	15C1	GGCACAGTCAGGTGAATTTG	GCGTGAATGATGAGGTGAATC
<i>APC</i>	15C2	CACCAGTAAACCTATACCACA	GAGAACTCAGAGAGGAATTATG
<i>APC</i>	15C3	CCAAAGACATACCAGACAGAG	CTACTTACTATGGAATTTGCACC
<i>APC</i>	15C4	CAAGACTCAAGGGTGATAATGA	CAGGACTTGTACTTGAGGAGC
<i>APC</i>	15D1	CAGCCCCTTCAAGCAAACATG	GTTTGGTAAGGTTCTGTTGGC
<i>APC</i>	15D2	CTCAACTTCCAAGGACATCATC	GTGGGACTGAGATTAGGTGG
<i>APC</i>	15D3	CTAGGTCCCAGGCACAAAC	CAATTCTACCCAAACATCCTC
<i>APC</i>	15D4	CCGTTTCTCAGGTGCTAC	GAGTCACTCTGGCAGCAAC
<i>APC</i>	15E1	CCCTGTATCAGAGACTAATGAAAG	GGAAGTTGGGATGGGATGC

* Para o exon 15, realizar a reação de PCR com *primers* 1F e 4R (exemplo: 15A1F e 15A4R; 15B1F e 15B4R, e assim por diante) e, em seguida, executar o sequenciamento com os *primers* internos.

Anexo 3 - Tabela com todas as alterações encontradas no sequenciamento do exoma através do SOLiD após a aplicação de filtros robustos (207 SNVs e 35 INDELS).

Amostras	Crom.	Posição	Variante ref.	Variante Mut.	% alterado	Região	Gene	Códon ref.	Códon var.	AA ref.	AA var.	Tipo de alteração
SNPs												
FB10T	17	74465266	15	9	37.50	CDS	AANAT	GTC	ATC	V	I	NSY
FB6T	17	67252402	19	5	20.83	CDS	ABCA5	AAT	TAT	N	Y	NSY
FB1T	16	48172244	18	5	21.74	CDS	ABCC12	ATT	GTT	I	V	NSY
FB2T	10	101611359	57	25	30.49	CDS	ABCC2	ATT	TTT	I	F	NSY
FB2T	18	47311718	25	11	30.56	CDS	ACAA2	AAT	GAT	N	D	NSY
FB2T	18	47311717	22	11	33.33	CDS	ACAA2	AAT	AGT	N	S	NSY
FB9T	17	35627752	31	15	32.61	CDS	ACACA	GCA	CCA	A	P	NSY
FB9T	17	35627751	30	15	33.33	CDS	ACACA	GCA	GGA	A	G	NSY
FB2T	2	207395608	22	17	43.59	SpSite	ADAM23	-	-	-	-	-
FB9T	4	175899098	72	18	20.00	CDS	ADAM29	TTG	GTG	L	V	NSY
FB5T	4	175899098	28	6	17.65	CDS	ADAM29	TTG	GTG	L	V	NSY
FB5T	9	136307562	10	5	33.33	CDS	ADAMTS13	CCA	ACA	P	T	NSY
FB1T	3	64607988	31	5	13.89	CDS	ADAMTS9	AAG	CAG	K	Q	NSY
FB2T	1	154574475	65	9	12.16	CDS	ADAR	GGT	AGT	G	S	NSY
FB3T	1	154574475	38	5	11.63	CDS	ADAR	GGT	AGT	G	S	NSY
FB2T	7	150840963	15	9	37.50	CDS	AGAP3	CCC	CTC	P	L	NSY
FB5T	8	6605227	22	6	21.43	CDS	AGPAT5	ATA	ACA	I	T	NSY
FB6T	14	105413143	18	6	25.00	CDS	AHNAK2	CCA	CTA	P	L	NSY
FB6T	7	91603139	17	9	34.62	CDS	AKAP9	TTG	ATG	L	M	NSY
FB8T	17	19575196	36	6	14.29	CDS	ALDH3A2	AAA	AGA	K	R	NSY
FB1T	2	73718040	37	10	21.28	CDS	ALMS1	TTT	TCT	F	S	NSY
FB2T	2	73718040	77	19	19.79	CDS	ALMS1	TTT	TCT	F	S	NSY
FB7T	2	73718040	41	10	19.61	CDS	ALMS1	TTT	TCT	F	S	NSY
FB9T	2	73678609	61	12	16.44	CDS	ALMS1	GAC	GCC	D	A	NSY
FB4T	2	73718040	39	9	18.75	CDS	ALMS1	TTT	TCT	F	S	NSY
FB5T	2	73718040	45	8	15.09	CDS	ALMS1	TTT	TCT	F	S	NSY
FB6T	2	73718040	33	8	19.51	CDS	ALMS1	TTT	TCT	F	S	NSY
FB8T	2	73718040	45	8	15.09	CDS	ALMS1	TTT	TCT	F	S	NSY
FB4T	4	73956597	39	23	37.10	CDS	ANKRD17	CCA	TCA	P	S	NSY
FB7T	1	94639448	47	15	24.19	CDS	ARHGAP29	GGT	AGT	G	S	NSY
FB6T	11	129062050	45	17	27.42	CDS	ARHGAP32	GTC	GAC	V	D	NSY
FB6T	6	69666555	12	9	42.86	CDS	BAI3	CAG	CTG	Q	L	NSY
FB2T	5	70805932	46	10	17.86	CDS	BDP1	GTA	CTA	V	L	NSY
FB4T	X	18221749	41	23	35.94	CDS	BEND2	GCA	GAA	A	E	NSY
FB5T	15	90167032	53	10	15.87	CDS	C15ORF42	GGC	GCC	G	A	NSY
FB8T	15	90167032	50	11	18.03	CDS	C15ORF42	GGC	GCC	G	A	NSY

FB10T	13	24895617	66	9	12.00	CDS	C1QTNF9	GCG	GTG	A	V	NSY
FB2T	2	27804603	78	15	16.13	CDS	C2ORF16	GCT	TCT	A	S	NSY
FB9T	2	27804889	106	15	12.40	CDS	C2ORF16	CTC	CCC	L	P	NSY
FB9T	2	27804603	81	16	16.49	CDS	C2ORF16	GCT	TCT	A	S	NSY
FB10T	2	27804499	40	12	23.08	CDS	C2ORF16	TGC	TAC	C	Y	NSY
FB9T	5	179069949	67	18	21.18	CDS	C5ORF60	TGT	CGT	C	R	NSY
FB9T	9	111853329	36	10	21.74	CDS	C9ORF5	GAA	GAT	E	D	NSY
FB4T	3	62503858	26	18	40.91	CDS	CADPS	CGA	TGA	R	*	STP
FB9T	2	55523187	52	9	14.75	CDS	CCDC88A	AAG	AAC	K	N	NSY
FB8T	2	204599618	25	20	44.44	CDS	CD28	GCA	ACA	A	T	NSY
FB8T	1	91967358	53	9	14.52	CDS	CDC7	AAA	TAA	K	*	NSY
FB9T	10	85970868	76	20	20.83	CDS	CDHR1	GTT	ATT	V	I	NSY
FB6T	19	42085790	25	9	26.47	CDS	CEACAM21	AAC	AGC	N	S	NSY
FB3T	16	67863762	27	9	25.00	CDS	CENPT	CAC	CAG	H	Q	NSY
FB6T	16	67863762	26	3	10.34	CDS	CENPT	CAC	CAG	H	Q	NSY
FB5T	11	125503234	40	1	2.44	CDS	CHEK1	ATG	GTG	M	V	NSY
FB7T	12	125503234	6	4	40.00	CDS	CHEK1	ATG	GTG	M	V	NSY
FB2T	1	25153580	16	9	36.00	CDS	CLIC4	AAG	CAG	K	Q	NSY
FB9T	1	25153580	24	11	31.43	CDS	CLIC4	AAG	CAG	K	Q	NSY
FB3T	3	1415613	21	5	19.23	CDS	CNTN6	GAA	AAA	E	K	NSY
FB3T	3	41266137	23	2	8.00	CDS	CTNNB1	TCT	TTT	S	F	NSY
FB5T	3	41266137	47	3	6.00	CDS	CTNNB1	TCT	TTT	S	F	NSY
FB10T	3	41266137	29	3	9.38	CDS	CTNNB1	TCT	TTT	S	F	NSY
FB1T	22	37705271	17	5	22	CDS	CYTH4	AAG	TAG	K	*	NSY
FB4T	4	41983939	43	13	23.21	CDS	DCAF4L1	CGT	TGT	R	C	NSY
FB4T	4	41983939	23	16	41.03	CDS	DCAF4L1	CGT	TGT	R	C	NSY
FB4T	7	14733771	28	16	36.36	CDS	DGKB	GTG	ATG	V	M	NSY
FB2T	12	124414277	24	9	27.27	CDS	DNAH10	TGG	GGG	W	G	NSY
FB4T	7	154519476	24	5	17.24	SpSite	DPP6	-	-	-	-	-
FB5T	7	154519476	22	6	21.43	SpSite	DPP6	-	-	-	-	-
FB1T	17	17997141	33	2	22.83	CDS	DRG2	CTG	ATG	L	M	NSY
FB5T	17	17997141	22	7	24.92	CDS	DRG2	CTG	ATG	L	M	NSY
FB9T	2	73989987	19	14	42.42	SpSite	DUSP11	-	-	-	-	-
FB9T	2	73989988	26	13	33.33	SpSite	DUSP11	-	-	-	-	-
FB9T	3	138191233	44	10	18.52	CDS	ESYT3	GGG	GAG	G	E	NSY
FB1T	10	61014164	36	5	41	CDS	FAM13C	GAC	CAC	D	H	NSY
FB9T	X	37027691	84	20	19.23	CDS	FAM47C	TTC	TGC	F	C	NSY
FB5T	4	155507577	61	10	14.08	CDS	FGA	AAC	ACC	N	T	NSY
FB4T	1	152328808	59	12	16.90	CDS	FLG2	GGC	GTC	G	V	NSY
FB2T	9	14737475	73	17	18.89	CDS	FREM1	TTG	TTT	L	F	NSY
FB9T	1	78428606	64	28	30.43	CDS	FUBP1	ACC	AAC	T	N	NSY
FB2T	7	43484839	1	10	90.91	CDS	HECW1	ACG	CCG	T	P	NSY
FB9T	5	179043886	78	13	14.29	CDS	HNRNPH1	ATG	ATA	M	I	NSY
FB9T	19	49657552	70	12	14.63	CDS	HRC	GGA	AGA	G	R	NSY
FB7T	2	198363406	26	8	23.53	CDS	HSPD1	GGG	GAG	G	E	NSY

FB8T	2	198363406	36	7	16.28	CDS	HSPD1	GGG	GAG	G	E	NSY
FB9T	2	198363406	58	8	12.12	CDS	HSPD1	GGG	GAG	G	E	NSY
FB6T	10	33217106	23	23	50.00	CDS	ITGB1	ATG	GTG	M	V	NSY
FB1T	21	46047591	43	9	17.31	CDS	KRTAP10-9	TGC	TAC	C	Y	NSY
FB6T	18	6956724	14	11	44.00	CDS	LAMA1	GAC	AAC	D	N	NSY
FB4T	18	21494777	16	12	42.86	CDS	LAMA3	CCT	ACT	P	T	NSY
FB4T	22	33733642	10	12	54.55	CDS	LARGE	AAC	ACC	N	T	NSY
FB6T	8	38250477	13	9	40.91	CDS	LETM2	TTG	TTT	L	F	NSY
FB2T	19	55107812	51	31	37.80	CDS	LILRA1	CAC	TAC	H	Y	NSY
FB9T	19	54744182	48	12	20.00	CDS	LILRA6	TTC	TAC	F	Y	NSY
FB8T	7	123302544	42	20	32.26	CDS	LMOD2	CGT	TGT	R	C	NSY
FB2T	16	22545899	71	10	12.35	CDS	LOC100132247	ACA	ATA	T	I	NSY
FB9T	15	52017218	60	14	18.92	CDS	LYSMD2	TTT	TAT	F	Y	NSY
FB2T	X	140995339	67	11	14.10	CDS	MAGEC1	TGG	GGG	W	G	NSY
FB8T	X	140994656	40	9	18.37	CDS	MAGEC1	TCC	TAC	S	Y	NSY
FB2T	7	77756581	31	10	24.39	CDS	MAGI2	CTA	CCA	L	P	NSY
FB9T	8	6289097	31	18	36.73	CDS	MCPH1	ATT	AAT	I	N	NSY
FB9T	8	6289096	33	18	35.29	CDS	MCPH1	ATT	TTT	I	F	NSY
FB1T	14	47504232	38	5	11.63	CDS	MDGA2	GTG	ATG	V	M	NSY
FB7T	14	47504232	25	7	21.88	CDS	MDGA2	GTG	ATG	V	M	NSY
FB9T	4	99956609	15	7	31.82	CDS	METAP1	TTA	TGA	L	*	STP
FB2T	19	36223242	5	6	54.55	CDS	MLL4	CCT	CAT	P	H	NSY
FB9T	1	16975289	48	11	18.64	SpSite	MST1P2	-	-	-	-	-
FB2T	11	47660301	56	8	12.50	CDS	MTCH2	AGA	TGA	R	*	NSY
FB5T	11	47660301	28	8	22.22	CDS	MTCH2	AGA	TGA	R	*	NSY
FB5T	11	47660295	27	8	22.86	CDS	MTCH2	TGT	CGT	C	R	NSY
FB5T	11	47660294	26	8	23.53	CDS	MTCH2	TGT	TAT	C	Y	NSY
FB5T	1	38301376	12	3	20.00	CDS	MTF1	CAC	AAC	H	N	NSY
FB8T	1	38301376	21	7	25.00	CDS	MTF1	CAC	AAC	H	N	NSY
FB8T	8	17228548	21	7	25.00	CDS	MTMR7	CCA	CGA	P	R	NSY
FB1T	7	100643560	38	18	32.14	CDS	MUC12	CGT	CAT	R	H	NSY
FB9T	7	100682124	98	22	18.33	CDS	MUC17	CTT	CAT	L	H	NSY
FB4T	7	100677737	23	5	17.86	CDS	MUC17	TTG	GTG	L	V	NSY
FB2T	3	195512981	43	9	17.31	CDS	MUC4	CCT	TCT	P	S	NSY
FB2T	3	195512789	50	13	20.63	CDS	MUC4	CCT	TCT	P	S	NSY
FB9T	3	195512981	57	16	21.92	CDS	MUC4	CCT	TCT	P	S	NSY
FB10T	3	195512789	32	9	21.95	CDS	MUC4	CCT	TCT	P	S	NSY
FB1T	3	195538618	18	5	21.74	CDS	MUC4	CAT	CCT	H	P	NSY
FB5T	3	195538618	8	5	38.46	CDS	MUC4	CAT	CCT	H	P	NSY
FB8T	3	195513076	26	6	18.75	CDS	MUC4	CGT	CCT	R	P	NSY
FB3T	11	1017529	107	22	17.05	CDS	MUC6	CAT	TAT	H	Y	NSY
FB8T	11	1018348	87	13	13.00	CDS	MUC6	CCT	TCT	P	S	NSY
FB8T	11	1016662	123	19	13.38	CDS	MUC6	CCT	TCT	P	S	NSY
FB9T	11	1017596	140	33	19.08	CDS	MUC6	CAA	CAC	Q	H	NSY
FB10T	11	1017529	95	18	15.93	CDS	MUC6	CAT	TAT	H	Y	NSY

FB10T	11	1017591	74	29	28.16	CDS	MUC6	CGA	CAA	R	Q	NSY
FB8T	2	204002968	24	15	38.46	CDS	NBEAL1	CGA	CAA	R	Q	NSY
FB8T	5	43277425	37	17	31.48	CDS	NIM1	ATG	GTG	M	V	NSY
FB7T	4	85416934	23	9	28.12	CDS	NKX6-1	GGA	GTA	G	V	NSY
FB3T	19	54313733	37	7	15.91	CDS	NLRP12	AAC	TAC	N	Y	NSY
FB6T	19	54313733	24	8	25.00	CDS	NLRP12	AAC	TAC	N	Y	NSY
FB10T	11	123900367	56	9	13.85	CDS	OR10G8	ATG	ACG	M	T	NSY
FB4T	1	248722738	36	12	25.00	CDS	OR2T29	ATG	TTG	M	L	NSY
FB10T	11	55110877	67	11	14.10	CDS	OR4A16	ATG	ATA	M	I	NSY
FB2T	8	52746236	27	9	25.00	CDS	PCMTD1	GAA	CAA	E	Q	NSY
FB2T	3	111638052	53	10	15.87	CDS	PHLDB2	TCT	TTT	S	F	NSY
FB1T	17	34894458	17	6	23	CDS	PIGW	TTT	TGT	F	C	NSY
FB8T	3	17053500	50	10	16.67	CDS	PLCL2	AAG	GAG	K	E	NSY
FB6T	14	39650980	17	9	34.62	CDS	PNN	AGG	AGT	R	S	NSY
FB2T	18	14542916	40	12	23.08	CDS	POTEC	ACG	AAG	T	K	NSY
FB2T	18	14542908	52	16	23.53	CDS	POTEC	GTG	ATG	V	M	NSY
FB10T	2	131976108	41	11	21.15	CDS	POTEE	ACT	GCT	T	A	NSY
FB2T	19	49377794	61	12	16.44	CDS	PPP1R15A	CGG	CAG	R	Q	NSY
FB1T	1	12919991	25	7	21.88	CDS	PRAMEF2	CAT	CGT	H	R	NSY
FB2T	5	23526903	67	10	12.99	CDS	PRDM9	ATT	ACT	I	T	NSY
FB2T	19	43690529	58	15	20.55	CDS	PSG5	ACA	ATA	T	I	NSY
FB2T	17	74288508	44	9	16.98	CDS	QRICH2	GAT	GTT	D	V	NSY
FB9T	20	56918806	26	9	25.71	CDS	RAB22A	CAA	CCA	Q	P	NSY
FB9T	20	56918805	25	9	26.47	CDS	RAB22A	CAA	AAA	Q	K	NSY
FB6T	3	133583460	16	6	27.27	CDS	RAB6B	TTC	CTC	F	L	NSY
FB7T	14	102729886	8	7	46.67	CDS	RAGE	CGA	TGA	R	*	STP
FB2T	21	15596778	29	10	25.64	CDS	RBM11	GGC	AGC	G	S	NSY
FB2T	4	39297364	50	13	20.63	CDS	RFC1	GTT	TTT	V	F	NSY
FB1T	1	182501860	68	12	15.00	CDS	RGSL1	TTG	GTG	L	V	NSY
FB5T	14	24620470	5	15	75.00	CDS	RNF31	GGA	GTA	G	V	NSY
FB2T	13	27828369	46	10	17.86	CDS	RPL21	TTG	TGG	L	W	NSY
FB5T	1	152127327	65	12	15.58	CDS	RPTN	CAT	GAT	H	D	NSY
FB8T	1	152127327	90	18	16.67	CDS	RPTN	CAT	GAT	H	D	NSY
FB9T	20	43836294	56	12	17.65	CDS	SEMGI	TCA	TTA	S	L	NSY
FB2T	4	52895087	23	15	39.47	CDS	SGCB	ATT	CTT	I	L	NSY
FB9T	4	52895087	32	12	27.27	CDS	SGCB	ATT	CTT	I	L	NSY
FB8T	3	164716365	38	26	40.62	CDS	SI	AAC	AAA	N	K	NSY
FB2T	14	72190413	40	28	41.18	CDS	SIPA1L1	CGG	TGG	R	W	NSY
FB2T	7	122839916	19	18	48.65	CDS	SLC13A1	GTC	ATC	V	I	NSY
FB2T	1	67512971	25	13	34.21	CDS	SLC35D1	GTA	ATA	V	I	NSY
FB9T	1	67512971	27	10	27.03	CDS	SLC35D1	GTA	ATA	V	I	NSY
FB2T	17	7385709	34	10	22.73	CDS	SLC35G6	GGT	CGT	G	R	NSY
FB2T	9	108118494	55	11	16.67	CDS	SLC44A1	GCA	ACA	A	T	NSY
FB2T	12	20893178	31	12	27.91	CDS	SLCO1C1	ATA	GTA	I	V	NSY
FB4T	13	37427573	12	9	42.86	CDS	SMAD9	CGG	TGG	R	W	NSY

FB7T	6	71501465	48	9	15.79	CDS	SMAP1	AAA	ATA	K	I	NSY
FB9T	6	71501465	60	12	16.67	CDS	SMAP1	AAA	ATA	K	I	NSY
FB4T	11	14284276	34	20	37.04	CDS	SPON1	CCG	TCG	P	S	NSY
FB10T	1	29475185	26	9	25.71	CDS	SRSF4	TCC	ACC	S	T	NSY
FB6T	2	191934456	14	8	36.36	CDS	STAT4	GAC	TAC	D	Y	NSY
FB10T	12	11174515	55	9	14.06	CDS	TAS2R19	CCC	CTC	P	L	NSY
FB8T	12	11286214	34	9	20.93	CDS	TAS2R30	CAG	CAC	Q	H	NSY
FB2T	12	11244096	50	16	24.24	CDS	TAS2R43	ATA	GTA	I	V	NSY
FB9T	14	20876457	90	13	12.62	CDS	TEP1	AAG	GAG	K	E	NSY
FB2T	2	85554300	85	12	12.37	CDS	TGOLN2	GAC	GAG	D	E	NSY
FB9T	18	254357	23	12	34.29	SpSite	THOC1	-	-	-	-	-
FB8T	13	103296931	25	16	39.02	CDS	TPP2	ATT	GTT	I	V	NSY
FB9T	22	38120707	84	14	14.29	CDS	TRIOBP	ACC	ATC	T	I	NSY
FB9T	10	75072391	41	17	29.31	CDS	TTC18	TTA	TAA	L	*	NSY
FB9T	10	75072390	42	17	28.81	CDS	TTC18	TTA	TTT	L	F	NSY
FB2T	5	94830497	29	12	29.27	CDS	TTC37	AAG	GAG	K	E	NSY
FB9T	22	50659471	111	20	15.27	CDS	TUBGCP6	ATC	ACC	I	T	NSY
FB10T	18	9887726	61	11	15.28	CDS	TXNDC2	GAT	GGT	D	G	NSY
FB9T	7	100349614	110	34	23.61	CDS	ZAN	CTC	CCC	L	P	NSY
FB9T	13	32884862	34	9	20.93	CDS	ZAR1L	GAA	AAA	E	K	NSY
FB5T	8	146156498	35	9	20.45	CDS	ZNF16	ACC	CCC	T	P	NSY
FB9T	9	97063226	45	11	19.64	CDS	ZNF169	GAT	GAG	D	E	NSY
FB2T	7	99669415	68	13	16.05	CDS	ZNF3	AAT	AGT	N	S	NSY
FB4T	5	150275733	36	6	14.29	CDS	ZNF300	AGT	AGA	S	R	NSY
FB4T	19	57869006	30	8	21.05	CDS	ZNF304	AGT	AAT	S	N	NSY
FB9T	19	21719693	45	6	11.76	CDS	ZNF429	TCT	ACT	S	T	NSY
FB6T	9	95618564	22	5	18.52	CDS	ZNF484	AGT	TGT	S	C	NSY
FB9T	19	22847465	15	6	28.57	CDS	ZNF492	TCT	ACT	S	T	NSY
FB9T	19	52942245	92	18	16.36	CDS	ZNF534	CAA	CGA	Q	R	NSY
FB9T	19	37488364	55	15	21.43	CDS	ZNF568	CAT	TAT	H	Y	NSY
FB9T	19	58290665	75	12	13.79	CDS	ZNF586	GTG	TTG	V	L	NSY
FB2T	19	52618811	51	9	15.00	CDS	ZNF616	TTT	CTT	F	L	NSY
FB2T	19	52618811	51	9	60	CDS	ZNF616	TTT	CTT	F	L	NSY
FB9T	19	22362777	44	9	16.98	CDS	ZNF676	AAA	ATA	K	I	NSY
FB8T	8	7215970	77	21	21.43	CDS	ZNF705G	TAT	TGT	Y	C	NSY
FB9T	19	35449000	64	14	17.95	CDS	ZNF792	GAA	CAA	E	Q	NSY

Indels										
Amostras	Crom.	Posição	Referência	Alterada	Variante ref.	Variante Mut.	% alterado	Região	Gene	Tipo de alteração
FB2T	16	16232207	TT	T	6	9	60%	CDS	ABCC1	Frameshift
FB5T	4	74270872	AA	A	10	3	23%	CDS	ALB	Frameshift
FB5T	4	74270872	AA	A	10	3	23%	CDS	ALB	Frameshift
FB2T	2	39170941	TT	T	0	15	100%	CDS	ARHGEF33	Frameshift
FB5T	14	58796357	T	TA	7	3	30%	CDS	ARID4A	Frameshift
FB4T	14	52471024	AT	ATAAAT	0	11	100%	CDS	C14orf166	Frameshift
FB8T	20	20163576	AA	A	7	4	36%	CDS	C20orf26	Frameshift
FB5T	1	181689804	GA	G	6	5	45%	CDS	CACNA1E	Frameshift
FB1T	1	43825587	G	GTGAG	18	7	28%	CDS	CDC20	Frameshift
FB2T	3	1427454	CC	C	34	18	35%	CDS	CNTN6	Frameshift
FB2T	13	40254283	AAACA	A	8	5	38%	CDS	COG6	Frameshift
FB2T	6	132168996	G	GTTGT	8	14	64%	CDS	ENPP1	Frameshift
FB6T	9	96233421	A	AAC	11	2	15%	SpSite	FAM120A	-
FB7T	12	100994159	GG	G	19	4	17%	SpSite	GAS2L3	-
FB7T	5	140032607	G	GAG	15	2	12%	CDS	IK	Frameshift
FB4T	21	35229030	TGT	T	4	6	60%	CDS	ITSN1	Frameshift
FB5T	12	49937660	CC	C	5	8	62%	CDS	KCNH3	Frameshift
FB5T	12	49937660	CC	C	5	8	62%	CDS	KCNH3	Frameshift
FB5T	6	138628597	TT	T	12	6	33%	CDS	KIAA1244	Frameshift
FB2T	11	71806403	CC	C	12	16	57%	CDS	LRTOMT	Frameshift
FB8T	19	12958435	CTC	C	10	2	17%	CDS	MAST1	Frameshift
FB9T	13	29881590	GGG	G	16	3	16%	CDS	MTUS2	Frameshift
FB10T	9	113491009	T	TT	13	12	48%	CDS	MUSK	Frameshift
FB9T	4	106879600	ACA	A	11	2	15%	CDS	NPNT	Frameshift
FB10T	11	55861279	TT	T	19	15	44%	CDS	OR8I2	Frameshift
FB2T	2	68389573	A	ATA	14	4	22%	CDS	PNO1	Frameshift
FB5T	17	2270720	C	CAGTT	13	2	13%	CDS	SGSM2	Frameshift
FB9T	19	38673133	TT	T	10	14	58%	CDS	SIPA1L3	Frameshift
FB9T	1	153750219	CC	C	16	12	43%	CDS	SLC27A3	Frameshift
FB2T	1	168281935	T	TT	18	8	31%	CDS	TBX19	Frameshift
FB2T	10	25312103	A	AA	10	8	44%	SpSite	THNSL1	-
FB7T	14	81467864	CAT	C	7	3	30%	CDS	TSHR	Frameshift
FB5T	1	229783280	G	GAGCA	15	2	12%	CDS	URB2	Frameshift
FB5T	16	716272	C	CACCAC	8	2	20%	CDS	WDR90	Frameshift
FB10T	17	40946910	C	CTT	16	3	16%	CDS	WNK4	Frameshift

* **Verde** – alterações validadas; **vermelho** – alterações analisadas, mas também encontradas no sangue; **Amarelo** – alterações analisadas, mas não validadas.