

**ALTERAÇÕES GENÔMICAS NO CARCINOMA
ADRENOCORTICAL DE PACIENTES PORTADORES
DA SÍNDROME DE LI-FRAUMENI**

FERNANDA PASCHOAL FORTES

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

Área de Concentração: Oncologia

Orientador: Dra. Maria Paula Curado

Co-orientador: Prof. Dra. Silvia Regina Rogatto

São Paulo

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Fortes, Fernanda Paschoal

Alterações genômicas no carcinoma adrenocortical de pacientes portadores da Síndrome de Li-Fraumeni / Fernanda Paschoal Fortes - São Paulo, 2018.

127p.

Tese (Doutorado) - Fundação Antônio Prudente.

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

Orientadora: Maria Paula Curado

Descritores: 1. Síndrome de Li-Fraumeni/Li-Fraumeni Syndrome. 2. Carcinoma Adrenocortical/Adrenocortical Carcinoma. 3. Sequenciamento Completo do Genoma/Whole Genome Sequencing

“Não importa como seu coração está aflito,
se você continuar acreditando,
o sonho que você deseja,
se tornará realidade.”
(Cinderela)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Cesar (in memorian) e Creuza, que dignamente me apresentaram à importância da família e o caminho da honestidade e persistência.

À Dra. Silvia R. Rogatto, que mais uma vez foi imprescindível e determinante para que o trabalho fosse finalizado da melhor forma possível, minha eterna gratidão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à **Deus** pela família e pela vida que tem sido repleta de alegrias e grandes oportunidades.

Às minhas orientadoras, **Dra. Maria Paula Curado, Prof. Dra Silvia Regina Rogatto, Dra. Maria Isabel Achatz e Dra. Sharon A. Savage** por todo o ensinamento, incentivo e apoio ao longo do doutorado.

À **Dra Maria Isabel**, por todos esses anos em que trabalhamos juntas, por todas as oportunidades, carinho e confiança.

Aos **pacientes** que participaram desse estudo. Sendo que a busca do conhecimento sempre terá como objetivo principal a tentativa de beneficiar o maior número de pessoas possível.

À **Hellen Kuasne e Luisa M. do Canto** por toda ajuda, parceria, conselhos e amizade. Com certeza levarei vocês comigo para o resto da vida, e oceano nenhum será capaz de nos distanciar.

Aos amigos **Kelvin, Karina e Maísa** que fizeram parte de um dos momentos mais importantes da minha vida e que facilitaram muito para que o ano longe de casa fosse de muito aprendizado e diversão.

Aos amigos de laboratório, sem aos quais essa jornada não teria sido possível.

Ao Departamento de Oncogenética, em especial à **Amanda Franca**.

Aos amigos que fiz nos EUA, em especial **Rotana Alsaggaf, Leah Vansciver e Felipe Achatz**.

Aos integrantes do *Clinical Genetics Branch*, que foram acolhedores e compreensíveis desde o primeiro dia, em especial **Payal Khincha e Mila Oasan**, “*my host mom*”.

À todos os colaboradores envolvidos nesse estudo: **Dra Patricia Prolla, Dra Carmen Fiori, Dra Tatiana El-Jaick, Dra Ana Best, Dr. Gonçalo Maria Forjaz, Dr. Max Moura de Oliveira e Dr. Chang Chan**.

Agradeço ao **Departamento Patologia**, às meninas do **Biobanco (Ana Paula, Eloisa e Louise)**, aos **pesquisadores e funcionários** do **CIPE**, à **Biblioteca** e à **Pós-Graduação**.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP** Processo: 2015/04202-2), e ao **NCI/CGB** (National Cancer Institute/ Clinical Genetics Branch) pelo suporte financeiro.

RESUMO

Fortes FP. **Alterações genômicas no carcinoma adrenocortical de pacientes portadores da Síndrome de Li-Fraumeni.** São Paulo; 2018. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

A Síndrome de Li Fraumeni (LFS) tem caráter autossômico dominante associada ao risco aumentado de câncer hereditário. Embora rara no mundo, no Brasil é frequente devido à ocorrência de uma mutação fundadora, a p.R337H *TP53*. A ocorrência de câncer e a idade de acometimento são variáveis mesmo em portadores da mesma mutação. Pacientes com mutações no gene *TP53* podem desenvolver um amplo espectro de tumores, incluindo o carcinoma adrenocortical (ADR). Os mecanismos moleculares envolvidos na carcinogênese adrenocortical assim como os dados epidemiológicos associados a estes tumores são pouco explorados em literatura. Neste estudo, foram coletados e analisados os dados epidemiológicos dos ADR incluindo os efeitos de idade, período e coorte utilizando o banco de dados SEER, o qual reúne dados de 18 registros de câncer de base populacional dos EUA. Foi avaliado o perfil de alterações genômicas (*CytoScan HD Array, Affymetrix*) em ADR de pacientes com e sem a mutação p.R337H. Foi também comparado o perfil mutacional (sequenciamento do genoma) de três pacientes (tumor e tecido normal de 2 adultos e 1 criança) com ADR portadores da mutação *TP53* p.R337H. Entre os casos de ADR diagnosticados nos EUA, aproximadamente 80% ocorreram após a quarta década de vida. Nas análises de sobrevida, houve diferença estatística ($p < 0,05$) para gênero, com uma melhor sobrevida para as mulheres. Pacientes diagnosticados até os 19 anos e com doença localizada apresentaram uma sobrevida maior. A análise genômica em sete casos revelou 644 alterações. Os três casos positivos para a mutação p.R337H apresentaram 175 alterações genômicas (127 ganhos, 27 cnLOH e 21 perdas). Os quatro casos negativos para a

mutação apresentaram 469 alterações (326 ganhos, 63 cnLOH e 80 perdas). Apesar do pequeno número amostral, os casos ADR positivos para a mutação *TP53* p.R337H apresentaram um baixo nível de instabilidade genômica quando comparados com os casos não mutados. A análise de sequenciamento do genoma revelou alterações em genes previamente associados o ADR (como *TP53*, *CTNNB1* e *ATRX*). Foram identificadas alterações em cinco genes com potencial associação ao desenvolvimento do ADR: *HBB*, *MSR1*, *SH3TC2*, *LSS* e *ABCA4*. Apesar do pequeno número amostral, foram identificados novos genes que podem estar associados ao ADR, no entanto esses achados deverão ser confirmados em estudos conduzidos em um grupo amostral maior.

SUMMARY

Fortes FP. **[Genomic alterations profile in adrenocortical carcinoma of Li-Fraumeni Syndrome patients]**. São Paulo, 2018. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Li-Fraumeni syndrome (LFS) is an autosomal dominant disease with high risk to develop hereditary tumors. Although LFS is a worldwide rare disorder, in Brazil its incidence is higher due to the occurrence of a founder mutation, *TP53* p.R337H. The cancer occurrence and age of onset are variable even considering patients with the same mutation. Patients carrying *TP53* mutations can develop a large spectrum of tumors, including the adrenocortical carcinoma (ADR). The main molecular mechanisms and the epidemiological factors associated with these tumors are poorly explored in literature. In this study, epidemiological data of ADR were collected and analyzed, including the effects of age, period and cohort. The SEER database, which collects and publishes cancer incidence and survival data from 18 cancer registries from the USA, was used for this analysis. The genomic profile (*CytoScan HD Array, Affymetrix*) of ADR positive or negative for *TP53* p.R337H was also investigated. Furthermore, the mutational profile (Whole Genome Sequencing- WGS) of three ADR patients (normal and tumor samples - 2 adults and 1 pediatric case), all of them positive for *TP53* p.R337H mutation, were analyzed. Approximately 80% of the ADR cases diagnosed in the USA developed after the fourth decade of life. In the survival analyses, a statistical difference ($p < 0.05$) was observed for gender, with women showing better survival. Patients diagnosed up to the age of 19 and with localized disease presented better survival. The genomic analysis of seven cases revealed 644 genomic alterations. The three *TP53* p.R337H positive cases showed 175 genomic alterations (127 gains, 27 cnLOH and 21 losses). The four negative mutated cases presented 469 alterations (369 gains, 63 cnLOH and 80 losses). Despite the small set of samples, mutated

cases presented lower level of chromosome instability compared to cases not carrying this mutation. The WGS analysis identified alterations in genes previously associated with ADR (as *TP53*, *CTNNB1* and *ATRX*). In addition, five genes (*HBB*, *MSR1*, *SH3TC2*, *LSS* and *ABCA4*) potentially associated with the development of ADR were identified. This study revealed new genes that might be associated with ADR. However, further analysis are necessary in a larger number of samples to confirm our findings.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Distribuição das mutações germinativas do gene <i>TP53</i> de acordo com o códon (n=741)	7
Figura 2	Esquema representativo dos diferentes domínios da proteína p53 (representação sem escala)	10
Figura 3	Fluxograma das etapas realizadas neste estudo.....	25
Figura 4	Fluxograma das etapas realizadas para a análise do sequenciamento do genoma nos pacientes diagnosticados com ADR	41
Figura 5	Distribuição geográfica dos casos de ADR diagnosticados nos EUA no período de 1973 a 2014	45
Figura 6	Taxas de incidência padronizada por idade de diagnóstico do ADR, segundo o gênero. SEER (18) 1973 - 2014. Nota: Alisado por três anos.....	46
Figura 7	Gráfico com as taxas brutas de incidência de ADR em Cali, Costa Rica, Goiânia e Quito.....	47
Figura 8	Resultados das análises do efeito idade, período e coorte em pacientes com carcinoma adrenocortical na faixa etária de 0-19 anos	49
Figura 9	Análise do efeito do desvio local em pacientes portadores de carcinoma adrenocortical na faixa etária de 0-19 anos.....	50

Figura 10	Resultados das análises do efeito idade, período e coorte para pacientes com ADR na faixa etária de 20 a mais de 85 anos, de acordo com os dados obtidos no SEER 18.....	51
Figura 11	Análise do efeito do desvio local em pacientes adultos	52
Figura 12	Curvas de sobrevida Kaplan-Meier de pacientes com ADR, diagnosticados entre 1973 e 2009, em 18 registros americanos (SEER18).....	54
Figura 13	Imagem representativa do resultado da análise de RFLP, onde quatro pacientes foram positivos para a mutação p.R337H (ADR 21, 20, 22 e 19).....	56
Figura 14	Eletroferogramas resultantes do sequenciamento de Sanger para o gene <i>TP53</i>	56
Figura 15	Alterações genômicas distribuídas ao longo dos cromossomos em sete casos de ADR avaliados para alterações genômicas (<i>CytoScan HD, Affymetrix</i>).....	60
Figura 16	Distribuição das alterações genômicas detectadas em sete carcinomas adrenocorticais pediátricos	60
Figura 17	Perfil global de alterações em pacientes positivos para a mutação p.R337H no gene <i>TP53</i>	61
Figura 18	Alterações genômicas nos casos positivos para a mutação p.R337H estavam distribuídas ao longo dos cromossomos..	62
Figura 19	Perfil global de alterações em pacientes negativos para a mutação p.R337H no gene <i>TP53</i>	64

Figura 20	Alterações genômicas distribuídas ao longo dos cromossomos, nos casos negativos, para mutações no gene <i>TP53</i>	65
Figura 21	Gráfico com as médias de cobertura do sequenciamento para as amostras	69
Figura 22	Diagrama de Venn mostrando o número de alterações identificadas nos tres casos de ADR analisados neste estudo.	71-3

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1	Critérios clínicos para o diagnóstico da LFS	2
Quadro 2	Características clínicas e biológicas dos pacientes portadores de LFS	9
Tabela 1	Características clínicas e demográficas da coorte de 2014. Casos de carcinomas adrenocorticais no SEER 18, período de 1973 a 2014.....	44
Tabela 2	Taxas de incidência padronizadas por idade e tendência de ADR, segundo o gênero, nos Estados Unidos, no período de 1973-2014.....	45
Tabela 3	Sobrevida global aos 60 meses de 1498 pacientes portadores de carcinoma ADR, entre 1973 a 2009, SEER 18, segundo características sociodemográficas e clínicas....	53
Tabela 4	Resultado da investigação da mutação p.R337H nos pacientes com ADR.....	57
Tabela 5	Número total de alterações genômicas detectadas por indivíduo analisado	59
Tabela 6	Regiões com alterações compartilhadas entre os casos positivos para a mutação p.R337H no gene <i>TP53</i>	63
Tabela 7	Alterações identificadas exclusivamente em pelo menos dois pacientes positivos para a mutação p.R337H.....	64

Tabela 8	Regiões alteradas exclusivamente nos casos com ausência de mutações no gene <i>TP53</i>	66
Tabela 9	Processos biológicos identificados como alterados nos casos com a mutação p.R337H em relação aos negativos ..	68
Tabela 10	Lista de alterações presentes exclusivamente no caso de ADR pediátrico.....	75-6
Tabela 11	Lista de alterações presentes no caso ADR-32	78-9
Tabela 12	Lista de alterações presentes no caso ADR-38.....	80-3
Tabela 13	Lista de alterações consideradas patogênicas pela anotação InterVar.....	84

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AAPC*	<i>Average annual percentage changes</i>
ACMG	<i>American College of Medical Genetics and Genomics</i>
ADR*	<i>Adrenocortical carcinoma</i>
Alt	Alteração
APC*	<i>Age-Period-Cohort</i>
C	Celsius
Chr	Cromossomo
CID-O-3	Classificação Internacional de Doenças para Oncologia
CNA*	<i>Copy Number Alteration</i>
CnLOH*	<i>Copy neutral loss of heterozygosity</i>
CNV*	<i>Copy Number Variation</i>
COG*	<i>Children Oncology Group</i>
CONEP	Conselho Nacional de Saúde
CPC	Carcinoma de Plexo Coróide
DNA*	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
dNTP*	<i>Deoxynucleotide Triphosphates</i>
EDTA*	<i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i>
EUA	Estado Unidos da América
FFPE*	<i>Formalin-fixed, Paraffin-embedded</i>
GATK*	<i>Genome Analysis Toolkit</i>
IARC*	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IC	Intervalo de confiança
IVA*	<i>Ingenuity Variant Analysis</i>
LFS*	<i>Li-Fraumeni Syndrome</i>
MAPK*	<i>Mitogen Activated Protein Kinases</i>
MD	Maryland
ND	Não disponível
NB	Neuroblastoma
NCBI*	<i>National Center for Biotechnology Information</i>

NCI*	<i>National Cancer Institute</i>
ND	Nanodrop
NIH*	<i>National Institutes of Health</i>
Pb	Pares de bases
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
Ref	Referência
Rpm	Rotação por minuto
PR	Paraná
PoP	Possivelmente patogênica
PrP	Provavelmente patogênica
PQD*	<i>Physician Data Query</i>
RFLP*	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RS	Rio Grande do Sul
SAP*	<i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i>
SEER*	<i>Surveillance, Epidemiology and End Results</i>
SC	Santa Catarina
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP*	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SNV*	<i>Single Nucleotide Variants</i>
SPM	Sarcoma de Partes Moles
SPSS*	<i>Statistical Package for Social Science</i>
TBE*	<i>Tris-Borato-EDTA</i>
TP53*	<i>Tumor protein p53</i>
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UOPECCAN	União Oeste Paranaense de estudo e combate ao Câncer
USA*	<i>United States of America</i>
UV	UltraVioleta
WGS*	<i>Whole Genome Sequencing</i>

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	A síndrome de Li-Fraumeni	1
1.2	A síndrome de Li-Fraumeni e a mutação P.R337H	9
1.3	O carcinoma adrenocortical.....	14
2	OBJETIVOS	23
2.1	Objetivo Geral.....	23
2.2	Objetivos Específicos	23
3	CASUÍSTICA E MÉTODOS	24
3.1	Casuística.....	25
3.1.1	Coleta de dados do Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER)	25
3.1.2	Identificação do perfil de alterações genômicas em tumores adrenocorticais de pacientes com e sem a mutação p.R337H	27
3.1.3	Análise do genoma completo de pacientes com carcinoma adrenocortical	30
3.2	Métodos.....	31
3.2.1	Análise de dados do SEER	31
3.2.2	Extração de ácidos nucleicos	33
3.2.3	Investigação da mutação germinativa TP53 p.R337H em pacientes portadores de carcinomas adrenocorticais.....	34
3.2.4	Sequenciamento de Sanger	34
3.2.5	Detecção de alterações genômicas (SNPs e CNVs).....	37
3.2.6	Sequenciamento Total do Genoma	39
3.2.6.1	Processamento dos dados	39
3.2.6.2	Identificação de SNVs e Indels	40
4	RESULTADOS	43
4.1	Estudo epidemiológico com base no SEER	43
4.1.1	Taxas padronizadas	43

4.1.2	Modelo Idade-período-coorte	48
4.1.4	Pacientes pediátricos (0 a 19 anos)	48
4.1.5	Pacientes adultos (20 anos e mais).....	50
4.1.6	Análises de sobrevivência dos casos de ADR nos Estados Unidos	52
4.2	Análise do perfil de alterações genômicas dos pacientes LFS com ADR	55
4.2.1	Seleção e caracterização das amostras.....	55
4.2.2	Identificação da mutação TP53 p.R337H	55
4.2.3	Análise de alterações genômicas	58
4.2.4	Alterações presentes nos casos positivos para a mutação p.R337H	61
4.2.5	Alterações presentes nos casos negativos para a mutação p.R337H	64
4.2.6	Análise comparativa entre os pacientes positivos e negativos para a mutação p.R337H.....	67
4.3	Análise do genoma completo dos pacientes LFS com ADR.....	68
4.3.1	Overview das alterações de bases únicas e indels	69
4.3.2	Análise das variantes dos carcinomas adrenocorticais com a mutação TP53 p.R337H	69
5	DISCUSSÃO	85
6	CONCLUSÃO	106
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108

ANEXOS

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

APÊNDICE

Apêndice 1 Descrição das alterações identificadas em todos os casos positivos para a mutação p.R337H

1 INTRODUÇÃO

1.1 A SÍNDROME DE LI-FRAUMENI

A Síndrome de Li-Fraumeni (LFS, do inglês Li-Fraumeni syndrome; OMIM #151623) é caracterizada pela predisposição hereditária ao câncer. A LFS foi descrita em 1969 por Frederick Li e Joseph Fraumeni. Os autores descreveram uma nova síndrome hereditária ao câncer a partir da observação de prontuários médicos de crianças diagnosticadas com rabdomyossarcoma, as quais tinham também outros membros da família acometidos por câncer (LI e FRAUMENI 1969a e b).

O primeiro critério clínico da síndrome, foi definido como “clássico” (LI et al. 1988) e a partir daí diversos outros critérios foram descritos (BIRCH et al. 1994; EELES 1995; CHOMPRET et al. 2001; TINAT et al. 2009). O mais recente é conhecido como “Chompret revisado” e é considerado o critério de maior utilidade clínica (BOUGEARD et al. 2015). Os parâmetros que definem os critérios da LFS estão descritos no Quadro 1.

Quadro 1 - Critérios clínicos para diagnóstico da LFS.

Critério	Descrição	Referência
Clássico Li e Fraumeni	Sarcoma na infância ou em idade jovem (antes dos 45 anos) e familiar de 1º grau com qualquer câncer em idade jovem (antes dos 45 anos) e familiar de 1º ou 2º grau que tenha o diagnóstico de câncer em idade jovem (antes dos 45 anos) ou sarcoma em qualquer idade.	LI et al. 1988
Variante Birch	Câncer na infância ou sarcoma, SNC ou ADR antes dos 45 anos e familiar de 1º ou 2º grau com câncer típico da síndrome de Li- Fraumeni em qualquer idade e familiar de 1º ou 2º grau com qualquer câncer antes dos 60 anos de idade.	BIRCH et al. 1994
Eeles	E1: Presença de dois familiares de 1º ou 2º grau com tumor típico em qualquer idade (sarcoma, câncer de mama, tumor SNC, leucemia, ADR, melanoma, câncer de próstata, câncer pancreático) E2: Sarcoma em qualquer idade no paciente índice com dois dos seguintes tumores (podendo estar presentes no mesmo indivíduo): câncer de mama (pacientes com idade inferior à 50 anos) e/ou tumor SNC, leucemia, ADR, melanoma, câncer de próstata e pâncreas (pacientes com idade inferior à 60 anos) ou sarcoma em qualquer idade.	EELES 1995
Chompret	Sarcoma, SNC, ADR ou câncer de mama antes dos 36 anos e familiar de 1º ou 2º grau com câncer antes dos 46 anos ou familiar com múltiplos tumores primários em qualquer idade. Múltiplos tumores, incluindo dois que sejam do tipo sarcoma, ADR, mama ou SNC com o primeiro tumor diagnosticado antes dos 36 anos, independente da história familiar, ou ADR em qualquer idade independente da história familiar.	CHOMPRET et al. 2001
Chompret Modificado	Paciente índice com câncer típico da síndrome de Li- Fraumeni antes dos 46 anos e familiar de 1º ou 2º grau com câncer típico da Síndrome de Li- Fraumeni antes dos 56 anos (exceto câncer de mama, caso o probando tenha câncer de mama) ou múltiplos tumores. Paciente índice com múltiplos tumores, sendo pelo menos dois do espectro da LFS e o primeiro antes dos 46 anos ou ADR em qualquer idade ou câncer de mama antes dos 36 anos sem mutação nos genes <i>BRCA1</i> ou <i>BRCA2</i> .	TINAT et al. 2009
Chompret Revisado	Paciente índice com câncer típico da LFS antes dos 46 anos e ao menos um familiar de 1º ou 2º grau com câncer típico da LFS (exceto câncer de mama se o probando tiver câncer de mama) antes dos 56 anos ou com múltiplos tumores. Paciente índice com múltiplos tumores (exceto múltiplos casos de câncer de mama), sendo que dois destes devem pertencer ao espectro LFS e o primeiro deve ter se desenvolvido antes dos 46 anos. Paciente índice com ADR, CPC ou rabdomiossarcoma embrionário de subtipo anaplásico, independente da história familiar. Paciente índice diagnosticado com câncer de mama antes dos 31 anos de idade.	BOUGEARD et al. 2015

Legenda: SNC: Sistema Nervoso Central; ADR: Carcinoma Adrenocortical; CPC: Carcinoma de Plexo Coróide.

O aumento dos relatos de famílias com a LFS tem permitido a identificação de um espectro mais amplo dos tumores associados ao fenótipo e com isso, os critérios utilizados para a categorização destas famílias têm também sofrido modificações. Os tumores pediátricos mais frequentes associados à LFS são os carcinomas adrenocorticais (ADR), sarcomas de partes moles (SPM), osteossarcomas e tumores do sistema nervoso central (SNC). Nos jovens e adultos (16-51 anos), os tumores mais frequentes são o câncer de mama na pré-menopausa, SPM e osteosarcomas. Já nas idades mais avançadas (acima dos 51 anos), os tumores mais frequentes são os pancreáticos e de próstata (BOUGEARD et al. 2015; AMADOU et al. 2017).

Além dos tumores que fazem parte do espectro da LFS, outros podem ocorrer em uma idade mais precoce do que a esperada incluindo aqueles localizados no colón e reto, pulmão, pâncreas, melanoma, próstata, rim, testículo, laringe, cabeça e pescoço e ovário (VARLEY et al. 1997; CHOMPRET et al. 2000; NICHOLS et al. 2001; OLIVIER et al. 2003; WONG et al. 2006; GONZALEZ et al. 2009; RUIJS et al. 2010).

Estima-se que os pacientes com LFS apresentam 50% de risco de desenvolver tumores antes dos 30 anos de idade (MALKIN et al. 1990; BIRCH et al. 2001). Evidências em literatura indicam que indivíduos portadores desta síndrome e que desenvolveram algum tumor na infância sejam mais predispostos à ocorrência de outros tumores primários (HISADA et al. 1998). Notavelmente, o risco relativo de desenvolvimento de um

segundo tumor foi relatado como 83 vezes maior para indivíduos LFS que desenvolveram o seu primeiro câncer durante a infância (MAI et al. 2016).

A LFS tem caráter autossômico dominante. As mutações germinativas no gene *TP53* foram reconhecidas como a principal alteração molecular responsável pela síndrome (FREBOURG et al. 1991). Aproximadamente 70% (VARLEY et al. 1999) a 80% (OLIVIER et al. 2003) dos pacientes com espectro clássico da LFS apresentam mutações em *TP53*; esse número diminui consideravelmente quando se analisa as famílias que preenchem os critérios de Chompret modificado 2009, o qual varia de 18% (BOUGEARD et al. 2015) a 21% (RUIJS et al. 2010).

O gene *TP53*, um dos principais supressores de tumor descritos em literatura, codifica uma fosfoproteína nuclear que atua como um fator de transcrição ativado em resposta a diversas formas de estresse celular, incluindo expressão oncogênica, dano ao DNA, hipóxia, disfunção metabólica e estresse replicativo, após o qual implementa respostas apropriadas para se opor à iniciação do câncer (PETITJEAN et al. 2007; APARICIO e EAVES 2009; DEY et al. 2010; FENG et al. 2011; GAMBINO et al. 2013; AUBREY et al. 2016).

A proteína p53 atua na supressão da duplicação do DNA e da proliferação celular em resposta a danos ao DNA. A ativação da proteína p53 pode resultar em diversas repostas celulares, incluindo apoptose, senescência celular, reparo do DNA, adaptações metabólicas e alterações nas características celulares, como a diferenciação celular (LANE 1992; CICALESE et al. 2009; FENG et al. 2011; AUBREY et al. 2016).

O destino da célula após a ativação do *TP53* é determinado pelo tipo, duração e amplitude do sinal de estresse, bem como pelo contexto em que ocorre, como por exemplo, o tipo da célula. Além disso, a proteína p53 exerce um controle sobre a homeostase celular no estado estacionário, mesmo antes da ativação causada por sinais de estresse (AUBREY et al. 2016).

As mutações somáticas em *TP53* são encontradas em mais de 50% dos tumores (LATRONICO et al. 2001).), enquanto que em ADR são relativamente raras, previamente identificadas em até 33% de todos os casos (LIBÉ et al. 2007; ASSIÉ et al. 2014; PINTO et al. 2017). No entanto, LIBÉ e colaboradores (2007) observaram que os tumores de ADR com mutações somáticas eram maiores e também foram associados com características de pior prognóstico e menor sobrevida livre de doença. Em adição, estudos prévios indicaram que a perda de heterozigose do cromossomo 17p13 parece bastante frequente em tumores adrenocorticais malignos, identificado em 85% dos casos (GICQUEL et al. 2001; LIBÉ et al. 2007; PINTO et al. 2015).

Em conjunto, esses achados sugerem que mutações somáticas no gene *TP53* pode ser um evento tardio associado a um fenótipo mais agressivo na progressão do tumor adrenocortical ao passo que a perda de heterozigose em 17p13 associada a tumores malignos é um potencial marcador molecular para malignidade tumoral.

O gene *TP53*, localizado no cromossomo 17p13, é um supressor tumoral que está estritamente relacionado à tumorigênese de vários tipos de

câncer e a perda de função pode resultar de eventos mutacionais, perdas alélicas e alterações epigenéticas (LIBÉ et al. 2007).

Embora cerca de 50% dos tumores ADR pediátricos apresentem mutações germinativas em *TP53* (WASSERMAN et al. 2015), apenas 4-6% dos portadores desta mutação desenvolvem tumor (RIBEIRO et al. 2012). Em adição, apenas 3-6% de tumores ADR em adultos apresenta mutação germinativa do gene *TP53* (HERRMANN et al. 2012; RAYMOND et al. 2013).

Em 2015 BOUGEARD et al. analisaram uma coorte de 322 portadores de variantes em *TP53* e demonstraram que a idade média de desenvolvimento do primeiro câncer ocorre aos 25 anos de idade (BOUGEARD et al. 2015).

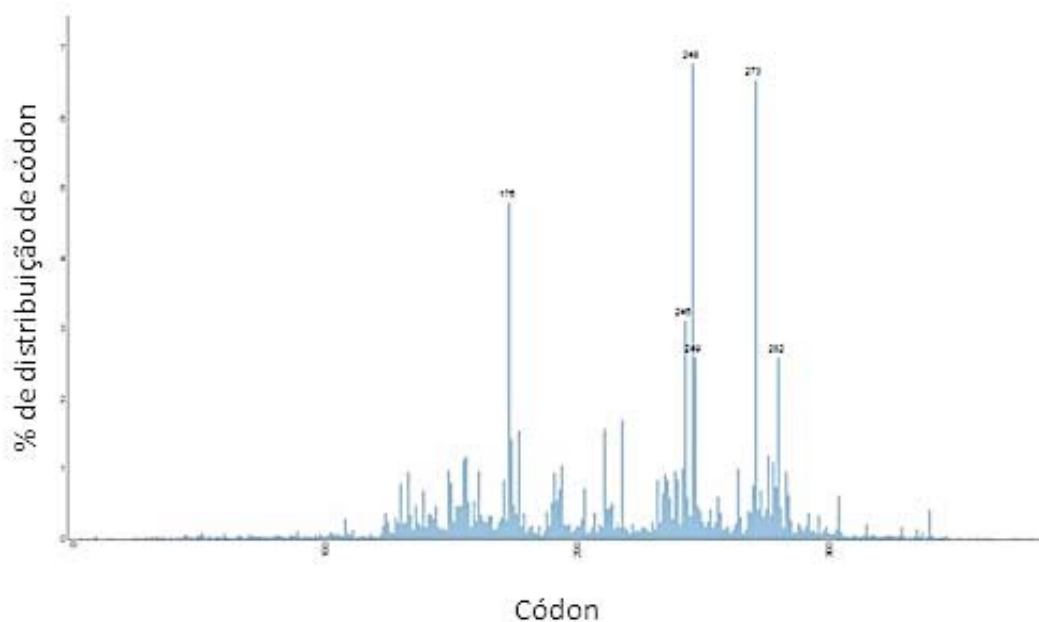
Resultados similares foram demonstrados por MAI et al. (2016) que avaliaram uma coorte de 286 indivíduos LFS positivos para mutações em *TP53*. Os autores relataram um risco estimado de 50% para portadores de mutações germinativas no gene *TP53* (mulheres aos 31 anos e homens aos 46 anos) desenvolverem uma ou mais neoplasias. Surpreendentemente, o risco se aproxima de 70-100% em idades acima de 70 anos para ambos os sexos (MAI et al. 2016).

Em contrapartida, recentemente, houve uma reavaliação do banco de dados do *International Agency for Research on Cancer* (IARC), que é formado por 2.079 portadores de variantes germinativas em *TP53*. Segundo esse estudo, os portadores apresentam 58% de risco de desenvolver um câncer antes dos 40 anos, sendo que a penetrância até os 70 anos foi

estimada em 80%. Na infância e adolescência, os homens possuem um risco maior devido a tumores como SPM e SNC. Já na fase adulta, a penetrância é maior nas mulheres, devido à alta ocorrência de câncer de mama, principalmente na faixa etária de 33 a 36 anos (AMADOU et al. 2017).

A alta variabilidade quanto à penetrância de câncer nesses indivíduos é relacionada principalmente com o tipo de mutação em *TP53* apresentada pelo paciente (AMADOU et al. 2017).

As mutações germinativas do *TP53* tendem a ocorrer predominantemente no domínio central de ligação ao DNA, codificado pelos éxons 5 a 8 e ainda nos éxons 4 e 9 (OLIVIER et al. 2003). A Figura 1 resume os sítios principais de mutações no gene *TP53*.



Fonte: BOUAOUN et al. (2016)

Figura 1 - Distribuição das mutações germinativas do gene *TP53* de acordo com o códon (n=27850).

A distribuição das mutações germinativas no gene *TP53* na LFS é similar ao identificado em tumores, com a maioria das mutações agrupadas dentro do domínio de ligação ao DNA (WASSERMAN et al. 2015).

Cerca de 38% das famílias LFS são diagnosticados com uma das variantes mais comuns encontradas nos *hotspots* de mutações recorrentes, envolvendo os códons 175 (R175H), 245 (G245S), 248 (R248Q, R248W), 273 (R273H) e 282 (R282W) (WASSERMAN et al. 2015; AMADOU et al. 2017). As variantes associadas com maior penetrância são as p.R175H, p.R248W, p.R273H e p.R282W, as quais estão associadas com um risco de desenvolvimento de tumores até 50% aos 30 anos de idade. As variantes p.R213Q e p.T125T apresentam um risco estimado de aproximadamente 20% considerando esta mesma faixa etária (BOUGEARD et al. 2015; AMADOU et al. 2017; GUHA e MALKIN 2017).

Foram também relatadas mutações intrônicas ou de regiões regulatórias; entretanto, o significado funcional destas alterações ainda precisa ser elucidado. O IARC mantém um banco de mutações germinativas e somáticas em *TP53* muito bem estabelecido e de fácil acesso (Versão R19, atualizado em Agosto de 2018, <http://p53.iarc.fr>).

A utilização de novas tecnologias de sequenciamento aplicadas para diversas doenças humanas tem aumentado consideravelmente nos últimos anos e permitido a identificação de novas mutações e alterações associadas ao fenótipo. Essas novas tecnologias de sequenciamento corroboram para o delineamento de novas estratégias de identificação de portadores da LFS. RANA et al. (2018) relataram que os pacientes testados por painéis de

genes tiveram a idade média de diagnóstico do primeiro câncer maior em homens (25 anos) e mulheres (oito anos) quando comparados aos casos testados para mutações em genes únicos usando as técnicas tradicionais de sequenciamento. Ademais, os pacientes que foram detectados com mutações germinativas em *TP53* (avaliados por *target-next generation sequencing*) tiveram uma frequência menor de tumores na infância e de cânceres característicos do espectro da síndrome. Interessantemente, estes pacientes nem sempre preenchem os critérios clínicos do diagnóstico da LFS (RANA et al. 2018).

Em um recente estudo, RENAUX-PETEL et al. (2018) relataram uma frequência de 14% de mutações *de novo* em um grupo de 336 pacientes com LFS, ressaltando que a presença de histórico familiar de câncer nem sempre é obrigatório para o diagnóstico da síndrome.

Além disso, com o uso das novas tecnologias de sequenciamento há a possibilidade de descoberta de novos genes que podem estar relacionados à LFS. Por exemplo, foram relatadas variantes no gene *CHEK2* em até 9% de famílias com histórico clínico de LFS negativas para mutações em *TP53* (RUIJS et al. 2009).

1.2 A SÍNDROME DE LI-FRAUMENI E A MUTAÇÃO P.R337H

No Brasil, é frequente uma forma variante da LFS devido à ocorrência de uma mutação fundadora no gene *TP53*, a p.R337H. Esta alteração é consequência da troca de um único nucleotídeo no códon 337 (CGC →

CAC) resultando na substituição de uma arginina por uma histidina. O códon 337 está localizado no éxon 10 do gene *TP53*, dentro do domínio de oligomerização (DI GIAMMARINO et al. 2002) (Figura 2).

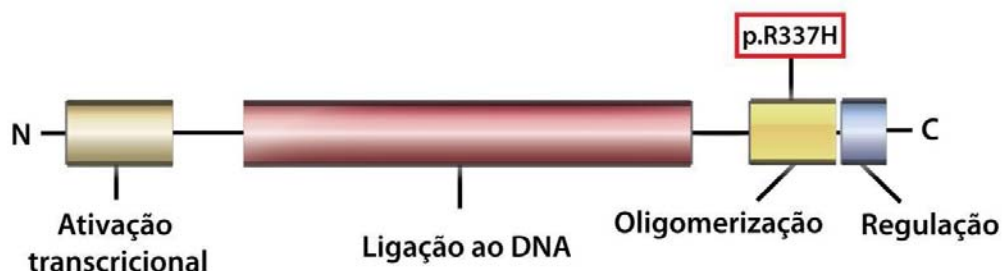


Figura 2 - Esquema representativo dos diferentes domínios da proteína p53 (representação sem escala). A p.R337H encontra-se fora do *hotspot* de mutações (domínio de ligação ao DNA).

O alelo R337H codifica uma proteína com uma mutação no domínio C-terminal. A histidina na posição 337 não age com uma ponte doadora de hidrogênio intermolecular quando o ambiente celular é alcalino e em altas temperaturas. Esta alteração de prótons, devido a substituição de arginina pela histidina afeta ponte com o aminoácido 352 resultando em tetrâmeros de p53 instáveis e eventualmente resultando em perda da função da proteína (DiGiammarino et al. 2002). Estudo prévio demonstrou que as propriedades de transcrição da proteína p.R337H (usando cDNA) não estava alterada em ensaios de ativação de gene repórter em condições fisiológicas (Ribeiro et al. 2001).

Em 1999, a mutação p.R337H do gene *TP53* foi descrita pela primeira vez em um paciente pediátrico com carcinoma adrenocortical (ADR)

(VARLEY et al. 1999). Em 2001, RIBEIRO et al. identificaram a presença da mutação germinativa p.R337H em 35 de 36 crianças com ADR provenientes de 28 famílias da periferia de Curitiba, PR. Neste estudo, os autores relataram não haver aumento do número de casos de câncer na família dos indivíduos portadores desta mutação. No entanto, descreveram a ocorrência de casos de câncer de mama, leucemia e câncer colorretal em parentes de primeiro e segundo grau. A partir deste estudo, ficou caracterizada uma forte associação entre a mutação germinativa p.R337H no gene *TP53* e o alto risco para o desenvolvimento de carcinomas adrenocorticais em crianças da região sul do Brasil (RIBEIRO et al. 2001).

O acúmulo excessivo da proteína p53 no núcleo da célula tumoral do córtex da adrenal, no qual ocorre alto índice de remodelamento tecidual no período neonatal e em crianças, corroborou inicialmente para a hipótese proposta por RIBEIRO et al. (2001), que propuseram que essa mutação era tecido-específica. Entretanto, diversos estudos comprovaram que os portadores da mutação p.R337H podem desenvolver todo o espectro de tumores característicos da LFS, além de outros tumores específicos, tais como carcinomas de plexo coróide pediátrico (CPC) (SEIDINGER et al. 2011) e neuroblastoma (NB) (SEIDINGER et al. 2015). É relatado também uma forte associação da mutação com o desenvolvimento de câncer de mama em idade jovem (ASSUMPÇÃO et al. 2008; GIACOMAZZI et al. 2014). Essa diversidade fenotípica, apesar da presença da mesma mutação no gene *TP53*, sugere que outras variações somáticas ou germinativas

podem ter um papel importante no tipo e risco de desenvolvimento do tumor assim como na idade de seu aparecimento.

A mutação p.R337H foi inicialmente avaliada em estudo conduzido por KATO et al. (2003). Neste estudo, a alteração *missense* foi considerada patogênica após ensaio de transativação de levedura (KATO et al. 2003). Posteriormente, foram realizados estudos bioquímicos e estruturais para avaliar o efeito mutagênico da proteína frente a ocorrência da alteração p.R337H. Foi verificado que a p.R337H formava oligômeros somente se houvesse condições específicas de pH (DI GIAMMARINO et al. 2002). A ocorrência de pH intracelular alcalino (acima de 7,0) e/ou temperatura acima de 36,5°C resultava na perda da função da p53, alterando as propriedades funcionais da proteína de forma pH-dependente (DI GIAMMARINO et al. 2002; HAINAUT 2002). Esta dependência de condições fisiológicas pode contribuir parcialmente para a penetrância incompleta e para os padrões de heterogeneidade tumoral observados em famílias brasileiras portadoras da p.R337H (GUHA e MALKIN 2017).

Ademais, a natureza única dependente do pH desta mutação pode ser influenciada pela fisiologia do córtex adrenal durante o desenvolvimento. Durante a embriogênese, o córtex adrenal desempenha um papel importante na manutenção da função e integridade da placenta e expande rapidamente para se tornar adulto. Pouco depois do nascimento, o córtex se reorganiza e regride devido a ativação da apoptose perdendo ~ 50% do seu peso (BLAND et al. 2003). Especula-se que uma célula adrenocortical que estava destinada a parar de se dividir durante a embriogênese ou morrer logo após

o nascimento continua a proliferar e sobreviver, resultando em tumores 2 a 3 anos mais tarde, consistentes com a idade das crianças que desenvolvem ADR (ACHATZ e ZAMBETTI 2016).

Estima-se que a mutação p.R337H esteja presente em 0,3% da população do Sul e Sudeste do Brasil (ACHATZ et al. 2007; PALMERO et al. 2008; CUSTODIO et al. 2013). Um estudo realizado no estado de São Paulo revelou a presença da mutação p.R337H em 14 de 18 crianças e em 5 de 37 adultos com ADR esporádico e sem história familiar de câncer (LATRONICO et al. 2001).

Em 2004, PINTO et al. analisaram dois marcadores polimórficos intragênicos (VNTR p53 e p53CA) em 22 pacientes (16 crianças e 6 adultos) e em 60 indivíduos normais. A hipótese do estudo foi que esta mutação teria origem comum, sendo caracterizada como fundadora. Os autores verificaram fortes evidências de que havia segregação entre os marcadores polimórficos e a mutação p.R337H, indicando que esta mutação se originou de um único ancestral (PINTO et al. 2004). Posteriormente, 12 indivíduos portadores da mutação p.R337H provenientes de oito famílias brasileiras aparentemente não-relacionadas foram genotipados para 29 TAG SNPs (GARRITANO et al. 2010). Os autores identificaram o haplótipo H3 em todos os indivíduos. Foi realizada uma PCR alelo-específica e demonstrou-se que a p.R337H está presente somente no haplótipo que apresenta o genótipo T no SNP28 (rs9894946). Estes dados confirmaram o efeito fundador associado com a mutação p.R337H do gene *TP53*.

1.3 O CARCINOMA ADRENOCORTICAL

O carcinoma adrenocortical é uma neoplasia rara, cuja incidência anual estimada é de cerca de 0,3 casos /milhão de indivíduos abaixo dos 15 anos de idade (YOUNG et al. 1986; STILLER 1994).

Atualmente, esses tumores são encontrados incidentalmente e sua prevalência é estimada em pelo menos 3% em indivíduos com idade superior a 50 anos e pode aumentar em até 10% em idosos (FASSNACHT e ALLOLIO 2009).

Segundo a Sociedade Americana de Cancer (do inglês: *American Cancer Society-ACS*) os ADR são tumores muito raros e o número exato de casos diagnosticados nos Estados Unidos da América (EUA) por ano é desconhecido. Estima-se que esse número seja aproximadamente de 200 casos/ano, sendo responsável por 0,2% das mortes por câncer nos EUA (SCHNEIDER et al. 2014; LIROV et al. 2015).

Em um estudo realizado utilizando o *Surveillance, Epidemiology and End Results Program* (SEER) que incluiu dados de 12 estados dos EUA, estimou-se que a incidência anual de ADR ajustada pela idade era de 0,72 casos/milhão (KEBEBEW et al. 2006; GOLDEN et al. 2009). Dados do Registro de ADR da Alemanha apontam que a incidência dessa neoplasia é de mais de 1 caso por milhão (FASSNACHT e ALLOLIO 2011). Os autores acreditam que essa incidência pode ser subestimada.

A importância dos registros de câncer bem consolidados, como o SEER, reside no fato de que eles coletam dados precisos e completos sobre

o câncer que podem ser usados para o controle do câncer e pesquisa epidemiológica, planejamento de programas de saúde pública e melhoria do atendimento ao paciente. Em última análise, todas essas atividades reduzem o ônus do câncer podendo colaborar a para que haja melhor compreensão da doença e para que esses recursos sejam utilizados para o melhor efeito na prevenção e tratamento.

O ADR é um tumor agressivo que acomete indivíduos de ambos os sexos, mas na maioria das séries publicadas há uma proporção maior de indivíduos do sexo feminino, levando a hipótese de que os hormônios relacionados ao sexo possam ter uma influência no desenvolvimento do ADR (ICARD et al. 2001; BILIMORIA et al. 2008; FASSNACHT e ALLOLIO 2009, 2011).

Apesar dos fatores de riscos associados ao ADR não serem bem elucidados, em um estudo caso-controle baseado no *National Mortality Followback Survey*, foi enviado um questionário aos parentes mais próximos de aproximadamente 20.000 adultos falecidos nos EUA. Foram identificados 176 pacientes que faleceram de ADR que foram comparados com 352 controles. Entre as mulheres, houve um risco aumentado para as que eram usuárias de contraceptivos orais, especialmente para as que fizeram uso antes dos 25 anos. Neste mesmo contexto, é notável que em dois estudos franceses independentes, foi identificada uma alta porcentagem de pacientes do sexo feminino diagnosticadas com ADR durante a gravidez (LUTON et al. 1990; HSING et al. 1996; ICARD et al. 2001).

O ADR ocorre em 6-13% (BOUGEARD et al. 2015; MAI et al. 2016) dos pacientes com LFS, apresentando uma distribuição bimodal, com um pico de incidência até os 5 anos de idade e outro após a quarta década de vida (LATRONICO e CHROUSOS 1997). Entretanto, esta distribuição não é observada no Registro de ADR da Alemanha, não sendo possível notar um pico absoluto na infância (FASSNACHT e ALLOLIO 2011). Nesse registro, a idade mediana de aparecimento da doença é de 46 anos (variação de 0,3 a 86

As manifestações sintomáticas do ADR estão relacionadas com a produção excessiva de esteróides do córtex adrenal, sendo a virilização (70-80%) e a síndrome de Cushing (20-30%) as manifestações endócrinas mais comuns. O estágio da doença, o qual inclui o tamanho do tumor, é o mais importante fator prognóstico. Os pacientes com doença residual após a ressecção incompleta do tumor ou doença metastática têm um prognóstico sombrio (MICHALKIEWICZ et al. 2004). Pacientes com ADR geralmente manifestam sintomas de massa abdominal, relacionados à produção hormonal autônoma pelo tumor (KERKHOFES et al. 2015). A maioria dos pacientes (40-60%) apresenta excesso de hormônio esteróide (glicocorticóides, mineralocorticóides, andrógenos) ou efeitos de massa abdominal (30%). Em casos mais raros (15–20%), os pacientes são diagnosticados incidentalmente durante testes diagnósticos ou de imagens por razões não relacionadas às glândulas supra-renais (ELSE et al. 2014; KERKHOFES et al. 2015).

Como base diagnóstica, o Instituto Nacional do Câncer (NCI – *National Cancer Institute*) e a Rede Europeia para o Estudo de Tumores Adrenais (ENS@T - *The European Network for the Study of Adrenal Tumors*) sugerem uma investigação inicial cuidadosa da história clínica e familiar do paciente e avaliação endócrina. O objetivo desses testes é revelar qualquer produção hormonal excessiva pelo tumor, a qual pode servir como marcador tumoral durante a terapia (NCI 2018; GAUJOUX e MIHAI 2017). O estadiamento é realizado usando imagens por tomografia computadorizada (TC) e/ou ressonância magnética do abdômen para a identificação do tumor primário e TC do tórax para a avaliação de possível metástase pulmonar (NCI 2018). Após a remoção do tumor é realizado o exame anatomopatológico para confirmação do diagnóstico (LIBÉ 2015).

O estadiamento do tumor ao diagnóstico é baseado no peso do tumor e na presença de metástases. Tumores menores que 100g que sofrem metástases são classificados como estadio I. Tumores maiores que 100g que não sofrem metástases são classificados como estadio II. Tumores que sofrem ruptura durante o procedimento cirúrgico ou apresentam metástase local são classificados como estadio III. Tumores com presença de metástase à distância (ex. pulmão, veia cava) são classificados como estadio IV (COG - ARAR 0332).

Como os protocolos quimioterápicos para o tratamento do ADR são pouco eficientes, o diagnóstico precoce e a ressecção cirúrgica são os fatores mais importantes para a cura do paciente (ZANCANELLA et al. 2006). Os pacientes diagnosticados com ADR estadio I e II são submetidos

somente à ressecção cirúrgica. Nestes casos, o prognóstico é bem melhor quando comparado aos estadios III e IV da doença. Pacientes com alto estadiamento são submetidos à quimioterapia além da cirurgia.

A sobrevida global livre de eventos adversos é de 50% e a sobrevida global dos pacientes em estadios avançados é ruim (RIBEIRO et al. 2012; MICHALKIEWICZ et al. 2004). Diferentemente de estudos conduzidos com outros tumores embrionários pediátricos (VALENTIJN et al. 2012; EHRLICH et al. 2013), o exame histopatológico e os achados moleculares descritos nos ADR pediátricos não levam a mudanças no prognóstico ou permitem o uso de terapias alvo-específicas (DEHNER e HILL 2009; EL WAKIL et al. 2011).

Segundo o *Adrenalcortical Carcinoma Treatment* (PQD®) disponibilizado pelo *National Cancer Institute* (NCI)- Bethesda, MD, EUA os três tipos de tratamento padrão para essa neoplasia são: cirurgia, terapia por radiação e quimioterapia. Ademais, há um estudo clínico em andamento que visa a utilização de anticorpos monoclonais que interferem na capacidade das células tumorais de crescerem e se espalharem em pacientes com tumores raros, incluindo o ADR (disponível em: www.cancer.gov/about-cancer/treatment/clinical-trials).

A maioria dos casos de ADR pediátricos pode ser detectada precocemente por sinais e sintomas de secreção elevada de corticosteróides (Mastellaro et al. 2018). A sobrevida dos pacientes estão diretamente associadas ao diagnóstico precoce e a presença de doença localizada. Além disso, o diagnóstico do ADR em uma criança representa um alerta para a

predisposição familiar ao câncer. A atenção primária à saúde, é o elo fundamental entre a suspeita diagnóstica e o tratamento adequado. Cabe aos centros de referência desenvolver estratégias de protocolos terapêuticos que forneçam aos pediatras novas formas de prevenção e medidas preditivas para crianças e famílias em risco de desenvolver câncer (MASTELLARO et al. 2018).

Por se tratar de uma neoplasia rara, o paciente que desenvolve carcinoma adrenocortical preenche critérios clínicos para a síndrome de Li-Fraumeni de acordo com o critério de Chompret modificado (TINAT et al. 2009). Além disso, o ADR pediátrico é mais prevalente em famílias LFS quando comparado aquelas sem critérios para a síndrome (MALKIN et al. 1990). Foi proposto que o paciente que desenvolve esse tipo de carcinoma na infância, tem uma alta probabilidade de apresentar mutações no gene *TP53* (WEST et al. 2007).

Em 2011, SEIDINGER et al. descreveram que aproximadamente 93% dos pacientes pediátricos portadores de carcinoma adrenocortical eram portadores da mutação p.R337H. Outro estudo mostrou que 11 em 292 crianças diagnosticadas com câncer pediátrico no Sudeste do Brasil, eram portadoras da mutação *TP53* p.R337H, nove delas foram diagnosticadas com ADR (GIACOMAZZI et al. 2013). Acredita-se que o diagnóstico desse tipo tumoral em crianças pode ser uma abordagem eficaz para detectar indivíduos e famílias com mutações germinativas no gene *TP53* com um alto risco de desenvolvimento de múltiplos tumores (CHOONG et al. 2012).

Nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, a incidência do ADR pediátrico é cerca de 10 a 15 vezes maior do que a observada em outras partes do mundo (SANDRINI et al. 1997), fato ligado à presença da mutação p.R337H. A penetrância estimada relacionada ao risco de desenvolvimento do ADR em portadores desta mutação é de 10% (FIGUEIREDO et al. 2006). Entretanto, um estudo de pacientes diagnosticados em um único centro (Campinas e região) mostrou que aproximadamente 93% dos pacientes com ADR pediátricos são portadores da mutação p.R337H (SEIDINGER et al. 2011).

Um dos principais estudos que investigou alterações moleculares em carcinomas adrenocorticais foi o de ASSIE et al. (2014). Os autores utilizaram dados de sequenciamento de exoma e SNP arrays em 45 carcinomas adrenocorticais e descreveram alto nível de amplificação de *TERT* (5p15.33) e *CDK4* (12q14) assim como deleções homozigotas de *CDKN2A* (9p21.3), *RB1* (13q14) e *ZNRF3* (22q12.1). Os genes previamente relatados como alterados nestes tumores foram confirmados (*CTNNB1*, *TP53*, *CDKN2A*, *RB1* e *MEN1*) e um grupo de genes ainda não descritos como associados ao fenótipo foram validados em 77 amostras de carcinomas adrenocorticais (*ZNRF3*, *DAXX*, *TERT* e *MED12*). A análise de metilação e de miRNA associados com os dados de mutações e alterações no número de cópias permitiu subdividir os tumores em dois grupos de acordo com o prognóstico (agressivos e indolentes).

A β -catenina é um componente importante de diferenciação do córtex supra-renal por meio da via de sinalização Wnt (KIM et al. 2008). O acúmulo

de β -catenina no citoplasma com conseqüente translocação ao núcleo e transcrição de alguns genes é o principal evento desta via de sinalização. O acúmulo da β -catenina pode causar a desregulação da via Wnt/ β -catenina acarretando crescimento e proliferação celular descontrolados (BERTHON et al. 2012). A via Wnt/ β -catenina está ativada em hiperplasias, adenomas e no carcinoma adrenocortical (BONNET et al. 2011). Além disso, mutações no gene *CTNNB1* que codifica a β -catenina são comumente descritas em pacientes com carcinomas adrenocorticais. Alterações na via Wnt/ β -catenina são associadas a um pior prognóstico em ADR adulto (BONNET et al. 2011).

PINTO et al. (2015) utilizaram sequenciamento do genoma total, do exoma e análise do transcriptoma em uma coorte de 37 ADR pediátricos brasileiros. Deste total, 12 eram portadores da mutação p.R337H e 13 tinham outras mutações no gene *TP53*. Os autores relataram que 91% dos casos apresentaram cnLOH (do inglês: *copy neutral loss of heterozygosity*) no cromossomo 11 e conseqüente expressão aumenta do *IGF2*. A cnLOH, a qual pode resultar em dissomia uniparental, ocorre quando parte de ou um cromossomo inteiro do mesmo par de homólogos é herdado de somente um genitor, perdendo assim o alelo do outro progenitor (KEEFE et al 2010).

A cnLOH no cromossomo 17 foi observada em 28 dos 37 ADR. Todos os tumores com mutação germinativa ou somática em *TP53* apresentaram cnLOH com seleção contra o alelo tipo selvagem. cnLOH do cromossomo 17 inteiro foi observada em todos os tumores associados com mutação germinativa no gene *TP53* assim como em dois de quatro casos com *TP53* selvagem. Nesse mesmo estudo, PINTO et al. (2015) relataram que clones

que apresentam cnLOH no cromossomo 17 e perdem o alelo selvagem *TP53*, tornam-se mais instáveis, acumulando SNVs (do inglês: single nucleotide variants). Os autores sugeriram que a cnLOH dos cromossomos 11 e 17 ocorrem durante o início da tumorigênese, antes da aquisição de alterações genômicas generalizadas, consistente com o fato de ser um evento desencadeador do processo tumoral.

Os tumores que apresentam altos níveis de instabilidade genômica foram associados com mutações somáticas no gene *ATRX* que codifica uma helicase que age na remodelação da cromatina e na manutenção do telômero. Talvez não surpreendentemente, esses tumores se correlacionaram com pior prognóstico. Segundo ACHATZ e ZAMBETTI (2016) a identificação de mutações que cooperam com p.R337H durante a tumorigênese, como *ATRX*, será importante para a compreensão da biologia ADR, o que poderá resultar em novos e mais eficazes tratamentos para este agressivo tumor pediátrico.

Há a necessidade de novos estudos neste raro tipo tumoral, incluindo epidemiológicos, para definir estratégias de tratamento mais eficazes e estabelecer técnicas de triagem para identificar portadores da mutação e com risco de desenvolver a doença.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os perfis de alterações genômicas de carcinomas adrenocorticais de pacientes provenientes de famílias LFS com e sem a mutação p.R337H.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever os dados epidemiológicos dos carcinomas adrenocorticais diagnosticados nos Estados Unidos, utilizando o banco de dados SEER (*Surveillance, Epidemiology and End Results Program*), disponibilizado pelo *National Cancer Institute* (NCI/NIH).
- Identificar as tendências de idade, ano e coorte de nascimento nas taxas de ADR dos EUA usando dados de registro de câncer.
- Investigar a presença da mutação *TP53* p.R337H no DNA tumoral e de sangue periférico de pacientes com ADR.
- Avaliar o perfil de alterações genômicas em tumores adrenocorticais de pacientes com e sem a mutação p.R337H;
- Comparar o perfil mutacional dos ADR de pacientes adultos e pediátricos portadores da mutação *TP53* p.R337H .

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética institucional (Protocolo nº 1903/14), pelos Comitês de Ética das instituições participantes e também pelo Conselho Nacional de Saúde (CONEP Protocolo nº 1.510.282). (Anexo 1)

Foram selecionados tumores provenientes de pacientes adultos e pediátricos portadores de carcinomas adrenocorticais, com diagnóstico clínico da LFS. A casuística foi composta por tecido tumoral desses pacientes e para os casos em que havia material disponível, foram utilizadas amostras de tecidos normais adjacentes.

Os centros colaboradores incluem: Hospital do Câncer de Cascavel (UOPECCAN), Cascavel/PR - coordenador do projeto na instituição: Dra. Carmem Fiori; Hospital Infantil Joana de Gusmão, Florianópolis/SC - coordenador do projeto na instituição: Dra. Tatiana El-Jaick; Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre/RS- coordenador do projeto na instituição: Dra. Patricia Ashton-Prolla.

Um esquema representativo das etapas desenvolvidas neste estudo está apresentada na figura 3.

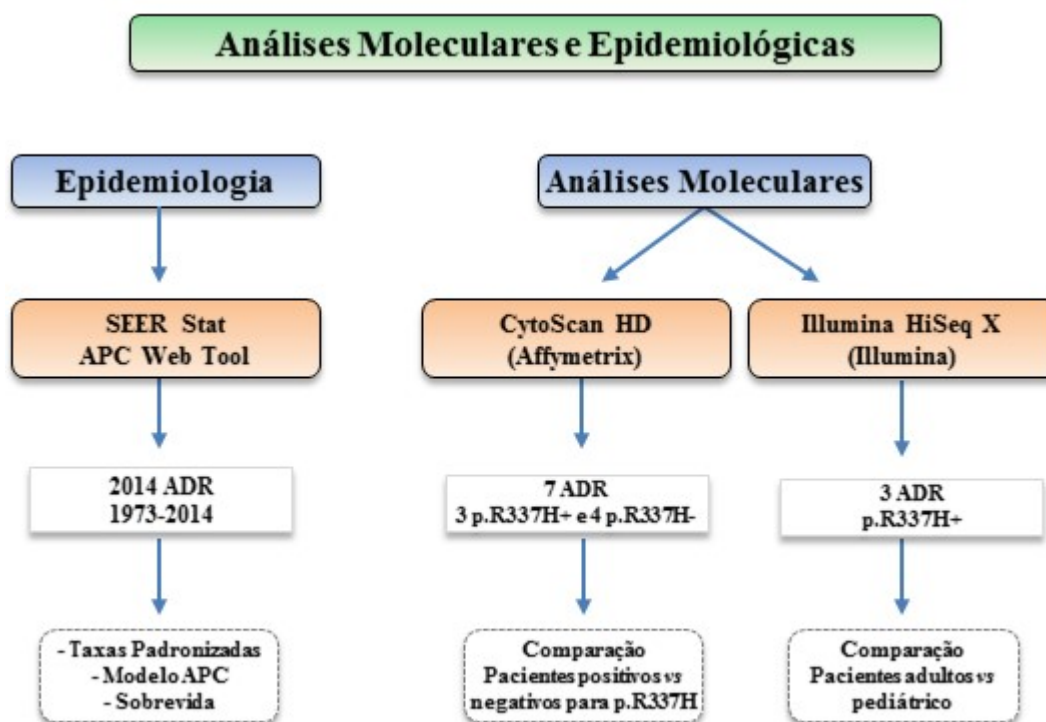


Figura 3 - Fluxograma das etapas realizadas neste estudo. Este estudo foi desenvolvido em tres etapas. Na etapa 1 foi realizado um levantamento epidemiológico do ADR utilizando os dados disponíveis no SEER. Na etapa 2, foi feita uma comparação das alterações genômicas (ganhos, perdas e cn-LOH) presentes nos casos positivos e negativos para a mutação *TP53* p.R337H. Na etapa 3, foi realizada a análise do genoma completo de pacientes adultos e pediátrico com ADR portadores da mutação *TP53* p.R337H.

3.1 CASUÍSTICA

3.1.1 Coleta de dados do *Surveillance, Epidemiology, and End Results* (SEER)

Os dados para avaliação epidemiológica utilizados são oriundos do *Surveillance, Epidemiology, and End Results* (SEER), *National Cancer Institute/ National Institutes of Health* (NCI/NIH). O SEER é uma fonte

autorizada de informações sobre a incidência e a sobrevida do câncer nos Estados Unidos.

Atualmente, o SEER (18) coleta e publica dados de 18 Registros de Câncer de Base Populacional (Atlanta, Connecticut, Detroit, Hawaii, Iowa, New Mexico, San Francisco-Oakland, Seattle-Puget Sound, Utah, Los Angeles, San Jose-Monterey, Rural Georgia, Alaska Native, Greater California, Greater Georgia, Kentucky, Louisiana, New Jersey), cobrindo aproximadamente 28% da população dos EUA (Disponível em: <https://seer.cancer.gov/>)

Neste estudo, foram incluídos todos os casos novos de carcinoma adrenocortical (ADR), de acordo com a classificação Internacional de Doenças para Oncologia (CID-O-3): 8370/3 - (IARC, 2013), registrados entre 1973 e 2014.

Foram extraídos os dados demográficos (gênero, idade, raça e estado de registro) e dados clínicos (tamanho do tumor -disponível a partir de 2004, lateralidade, estadiamento e *status* cirúrgico).

3.1.2 Identificação do perfil de alterações genômicas em tumores adrenocorticais de pacientes com e sem a mutação p.R337H.

Foram obtidas 37 amostras de ADR de diferentes Instituições: 16 casos do Departamento de Oncogenética do A.C. Camargo Cancer Center, 5 do Hospital Infantil Joana de Gusmão, 11 do Hospital de Clínicas do Rio Grande do Sul e 5 do Hospital de Câncer de Cascavel. Todas as amostras de tecido foram coletadas e rotineiramente fixadas em formol (4%) tamponado e embebidas em blocos de parafina (FFPE). Todos os casos foram revisados por um patologista. A revisão das lâminas foi realizada de forma anônima.

A idade dos indivíduos selecionados variou de 3 meses a 65 anos, com diagnóstico de carcinomas adrecorticais para a análise de mutações no gene *TP53* e subsequente análise de alterações genômicas. Destes casos, 10 não puderam ser avaliados para mutações germinativas no gene *TP53* por limitação metodológica (quantidade e ou qualidade da amostra). Para a análise de alterações genômicas, apenas sete casos tiveram qualidade suficiente para serem analisados (Quadro 2).

As amostras da nossa instituição (N= 16) foram obtidas do Banco de Macromoléculas do A.C.Camargo Cancer Center, SP. As demais amostras (N= 21) foram provenientes dos centros colaboradores, como descritos acima

Quadro 2 - Características clínicas e biológicas dos pacientes portadores de LFS.

ID	Sexo	Status	Metástase	Idade ao diagnóstico	Follow-up	Outros tumores primários	História familiar de câncer (parentesco, idade em anos)
ADR-1	M	Vivo	Não	2a	13a	Não	ND
ADR-2	F	Vivo	Não	4a	10a	Não	Gástrico (tia-avó paterna, 45), Gástrico (Bisavó paterna, 75), ND (Bisavô paterno)
ADR-3	F	Vivo	Não	3m	9a	Não	Útero (tia paterna, ND), Mama (tia paterna, 32), osso (avó paterna, 70)
ADR-4	F	Vivo	Não	1a	14a	Não	Mama (avó, 45), CCR e útero (Bisavó, ND), próstata (bisavô, ND), esofago (tia -avó, 70), intestino (tia-avó paterna, 32)
ADR-5	F	Vivo	Sim	1a	3a	Não	-
ADR-6	F	Óbito	Sim	11a	2a	Não	Ovário (irmã, 15), Fígado (bisavô materno, 60), ND (bisavô paterno, 57), ND (tio-avô, 50)
ADR-7*	M	Vivo	Não	2a	13a	Não	Estômago (bisavô paterno, 30), Estomago (tia-avó paterna, 60), mama (tia-avó paterna, 47), Estomago (tio-avô paterno, 60)
ADR-8	M	Vivo	Não	9m	11a	Não	Fígado (bisavô, 54)
ADR-9	F	Óbito	Não	5a	2a5m	Não	Esofago (Avô paterno, 54), Pulmão (bisavô materno, 54), CCR (tia-avó, ND), Fígado (tia-avó paterna, 45), garganta (tio-avô paterno, 45), Bexiga (bisavô paterno, 60)
ADR-10	M	Óbito	Sim	17a	1a	Não	Próstata (tio-avô materno, 59), mama (bisavó materna, 58)
ADR-11	F	Vivo	Não	6m	11a	Não	Próstata (tio paterno, 50), Pulmão (bisavô materno, 81)
ADR-12	F	ND	ND	1a	ND	ND	Mama (avó materna, 57), mama (tia paterna, 47)
ADR-13	M	Vivo	Não	17a	ND	ND	ND
ADR-14*	M	Óbito	Sim	6a	ND	Não	ND
ADR-15	M	Vivo	Sim	6a	2a11m	Não	Não
ADR-16	F	Óbito	Sim	5a	-	Não	Não
ADR-17*	F	Vivo	Não	1a2m	5a4m	Não	Não
ADR-18	F	Vivo	Não	1a	ND	Não	Não

Cont/ Quadro 2

ID	Sexo	Status	Metástase	Idade ao diagnóstico	Follow-up	Outros tumores primários	História familiar de câncer (parentesco, idade em anos)
ADR-19	M	Óbito	Sim	4a	-	Não	ND
ADR-20	F	Vivo	Não	2a	ND	Não	ND
ADR-21	F	Vivo	Não	6m	5a11m	Não	Não
ADR-22	M	Óbito	Sim	8a	ND	ND	ND
ADR-23*	M	ND	Não	6a	ND	ND	ND
ADR-24	F	Vivo	Não	30a	2a	Não	ND
ADR-25	F	Perda de seguimento	Perda de seguimento	46a	Perda de seguimento	Endométrio (42)	ND
ADR-26	M	Óbito	-	43a	-	Não	ND
ADR-27	F	Vivo	Não	6m	3a	Não	Sarcoma (pai, 1, 27 e 36), leucemia (avô paterno, 75), mama (tia paterna, 27)
ADR-28	M	Óbito	Não	65a	1a	Não	Próstata (tio materno, 70)
ADR-29	F	Vivo	Não	20a	8a	Não	Não
ADR-30	F	Óbito	Não	4a	-	Não	ND
ADR-31 [‡]	F	Óbito	Não	10a	8a	Linfoma H(7), STS (10, 12, 14, 16), Renal (17)	SNC (irmão, 19), Renal (pai, 40), SNC (avô paterno, 5)
ADR-32 [‡]	M	Vivo	Não	50a	8a	Próstata (50)	Renal (irmã, 61)
ADR-33	F	Vivo	Não	63a	1a	Leucemia (53)	Estômago (pai, 50), mama (irmã, 55), osso (tia paterna, ND)
ADR-34	M	Vivo	Não	24a	10a	Não	Não
ADR-35*	M	Vivo	Não	6a	ND	Não	Não
ADR-36*	F	Vivo	Não	11a	ND	Não	ND
ADR-37*	F	Vivo	Não	1a7m	10a	Não	ND
ADR-38 [‡]	F	Óbito	Não	62a	10m	Não	ND

Legenda: F: Feminino; M: Masculino; ND: Não disponível; a: anos; m: meses; CCR: Carcinoma Colorretal; SNC: Sistema Nervoso Central; (+) com mutação no gene *TP53*, (-) presença apenas dos alelos selvagem do *TP53* (não mutados). * Pacientes avaliados pela técnica de CytoScan. [‡] Pacientes analisados por WGS.

3.1.3 Análise do genoma completo de pacientes com carcinoma adrenocortical

A colaboração internacional estabelecida com o Dr. Chang Chan do *Rutgers Cancer Institute*-New Jersey, EUA e com a Dra. Sharon Savage do *National Cancer Institute*-Bethesda, EUA, permitiu que fosse realizado o sequenciamento do genoma completo de três amostras de pacientes diagnosticados com ADR. Os três pacientes (um pediátrico e dois adultos) são portadores da mutação germinativa *TP53* p.R337H. Todos os pacientes envolvidos nessa parte do estudo foram previamente identificados e registrados no banco de dados do Departamento de Oncogenética do A.C. Camargo Cancer Center, localizado no estado de São Paulo, Brasil e autorizaram a pesquisa (por Termo de Consentimento Livre e Esclarecido).

O caso ADR-31 é de uma paciente do sexo feminino que foi diagnosticada com ADR aos 10 anos de idade. Esta paciente foi acompanhada no Departamento de Oncogenética do A.C. Camargo Cancer Center por 11 anos e veio a óbito em maio de 2017.

O caso ADR-32 é um paciente do sexo masculino que foi diagnosticado com ADR aos 50 anos de idade. Após a cirurgia houve perda de *follow-up*; entretanto, esse paciente voltou a frequentar o serviço de Oncogenética da Instituição e faz acompanhamento há quatro anos. Atualmente está vivo e bem.

O caso ADR-38 é uma paciente do sexo feminino, que foi diagnosticada com ADR aos 62 anos. O estadiamento foi avançado ao diagnóstico e a paciente veio a óbito após 10 meses.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Análise de dados do SEER

A distribuição geográfica dos casos de ADR diagnosticados nos EUA foram plotados no mapa americano por meio da utilização do software *Philcarto* (disponível em: [ttp://perso.club-internet.fr/philgeo/](http://perso.club-internet.fr/philgeo/)).

As taxas de incidência foram padronizadas pela população padrão americana (2000 US Std Population). A coleta de dados e o cálculo da taxa padronizada foi realizado com a utilização do SEER*Stat *software* (versão 8.3.4).

Para a América do Sul foram descritas as taxas brutas de incidência do ADR (C74.0) para Cali (Colômbia), Costa Rica, Goiânia (Brasil) e Quito (Equador). Os dados foram obtidos nos volumes IX, X e XI da Incidência do Câncer em Cinco Continentes (CI5, IARC), disponíveis publicamente no site do IARC (<http://ci5.iarc.fr/Default.aspx>) (CURADO et al. 2007; FORMAN et al. 2013; FERLAY et al. 2014).

As taxas de incidência da população americana, foram analisadas para 3 anos e calculada a média anual de variações percentuais (AAPC, do inglês: *Average annual percentage changes*). O AAPC foi estimado pelo modelo de regressão linear, usando o programa Joinpoint (versão 4.6.0.0 - abril, 2018) desenvolvido pelo NCI/NIH, Bethesda, MD (disponível em <http://surveillance.cancer.gov/joinpoint/download>).

A homocedasticidade foi assumida para as análises de tendências. A variável independente foi o ano do diagnóstico, enquanto as taxas de

incidência padronizadas foram as variáveis independentes. AAPC foram estimadas por gênero. A significância estatística foi determinada por um intervalo de confiança de 95% (IC 95%).

As análises de efeito de idade-período-coorte (APC, do inglês: *Age-Period-Cohort*) foram calculados para identificar padrões nas taxas de incidência e mortalidade por câncer. Estas análises foram realizadas usando a ferramenta *APC web tool* desenvolvida por ROSENBERG et al. (2014) (disponível em <http://analysistools.nci.nih.gov/apc/>) para calcular desvios de idade, desvios de período, desvios de coorte, curva de idade longitudinal, curva de idade transversal, tendências temporais ajustadas e taxa de coorte.

Para a análise de sobrevida global aos 5 anos, foram incluídos todos os pacientes diagnosticados entre 01 de janeiro de 1973 à 31 de dezembro de 2009, com seguimento até 31 de dezembro de 2014. A sobrevida global foi truncada em 60 meses e analisadas segundo: gênero, faixa etária ao diagnóstico, raça, década de diagnóstico e extensão da doença (1970, 1980, 1990 e 2000).

A extensão da doença foi considerada como localizada (confinado a glândula adrenal), regional (invasão de estruturas adjacentes ou linfonodos acometidos) e à distancia (metastático).

O tempo de sobrevida foi calculado entre a data da última informação dos pacientes e a data do diagnóstico do tumor. Os casos foram estratificados em: vivo (pacientes com 60 ou mais meses completos de seguimento), óbito e perdido o seguimento (pacientes vivos com menos de 60 meses de seguimento). Para o cálculo da sobrevida, utilizou-se o

estimador do produto limite de Kaplan-Meier. Na comparação entre as curvas de sobrevida por variável e período aplicou-se o teste de *log rank*, ($p < 0,05$). Todas as análises estatísticas foram realizadas no *Statistical Package for Social Science* (SPSS) versão 23.0.0-201.

3.2.2 Extração de ácidos nucleicos

O DNA do sangue periférico e das amostras tumorais foram extraídos utilizando o Kit Blood and Tissue (*Qiagen*, Valencia, CA, EUA) conforme especificações do fabricante e seguindo as recomendações do protocolo do CytoScan HD para amostras fixadas em formalina e em blocos de parafina (FFPE) (Unlocking formalin-fixed paraffin-embedded samples with CytoScan®). As amostras de DNA extraídas foram quantificadas por espectrofotometria em NanoDrop (ND-1000 *Spectrophotometer* v.3.0.1, Labtrade) e por método fluorimétrico específico e sensível para quantificar a dupla fita de DNA (Qubit dsDNA BR Assay kit). Para cada amostra foi utilizado 1 μL de dsDNA BR Reagent (*Invitrogen*, Carlsbad, CA, USA), diluído em 199 μL de tampão fornecido pelo kit. Para a quantificação, foram utilizados 198 μL desse mix e 2 μL da amostra de interesse. A concentração foi aferida usando o Qubit® Fluorometer 2.0 (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, MA, USA), como recomendado pelo fornecedor (disponível em: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/Qubit_dsDNA_BR_Assay_UG.pdf). Para verificar a integridade do DNA genômico extraído, 300 ng de cada amostra foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% e corado com Gel Red (10.000x) (*Biotium*, CA, USA).

3.2.3 Investigação da mutação germinativa *TP53* p.R337H em pacientes portadores de carcinomas adrenocorticais

Após a obtenção do DNA a partir do sangue periférico, foram utilizados os iniciadores 5'- GCTGTATAGGTACTTGAAGTGCAG -3' e 3'-CGTCCCTGGGTTTGGATGTT- 5' para a amplificação do éxon 10 do gene *TP53*, onde se mapeia a mutação p.R337H. A amplificação deste éxon consistiu de 35 ciclos de desnaturação a 94°C, anelamento a 57°C e extensão a 68°C, utilizando-se 1µ da enzima Tth DNA polimerase (Biotools). O produto da PCR foi digerido com 5 µl da enzima HhaI (Fermentas) durante 16 horas a 37°C. A presença da mutação resultou na perda do sítio de restrição da enzima HhaI dentro do amplicon. Portanto, após a eletroforese do produto da digestão em gel de agarose 2% em tampão TBE 1X (SAMBROOK e RUSSELL 2001), os padrões de bandas observados foram: fragmentos de 168 pb e 92 pb em células homozigotas normais, fragmentos de 468 pb, 308 pb e 160pb em células heterozigotas para a p.R337H e uma banda de 468 pb em células homozigotas para a p.R337H. Como marcador de peso molecular no gel foi utilizado o Ladder 1Kb plus (Invitrogen). O gel foi corado com o intercalante de DNA dupla fita, GelRed (Biotium, CA, USA) e fotografado sob luz UV.

3.2.4 Sequenciamento de Sanger

As amostras de DNA extraídas do sangue periférico dos casos que tinham material disponível (N=11), foram sequenciadas utilizando a metodologia tradicional de SANGER e COULSON (1975), a fim de confirmar

a presença da mutação p.R337H e/ou avaliar a presença de outras mutações no gene *TP53*. O método consiste na adição de didesoxiribonucleotídeos (nucleotídeos modificados que não possuem um grupamento hidroxila OH no carbono 3' da pentose) marcados com fluoróforos que atuam inviabilizando a elongação da cadeia de nucleotídeos pela DNA polimerase após serem inseridos na cadeia recém-sintetizada. Para a remoção dos iniciadores e dNTPs remanescentes da PCR, 5 µL da solução contendo o fragmento dos genes de interesse amplificado foram purificados com 2 µL da mistura de enzima Exonuclease I (Exo I) e *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP) (USB). Foi utilizada placa de 96 poços para a incubação das amostras a 37°C por 30 minutos seguido de inativação por aquecimento a 80°C por 15 minutos. Após a purificação, foi realizada a reação de sequenciamento dos fragmentos de interesse bidirecionalmente em reações independentes. Foi adicionado a 3,5 uL de solução de PCR purificada o volume de 0,3 uL de iniciador *forward* ou *reverse*, 1 uL de BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems), 1,5 uL de tampão 5X Sequencing Buffer (Applied Biosystems) e 3,7 uL de água livre de nuclease (Sigma). A solução foi inicialmente desnaturada a 95°C por 2 minutos, seguido por 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 18 segundos, anelamento a 55°C por 18 segundos e extensão a 60°C por 4 minutos. O termociclador utilizado para a reação de amplificação do sequenciamento foi o 96-Well GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems). Após a extensão das fitas de DNA, procedeu-se a precipitação e lavagem. A placa contendo as reações foi centrifugada para sedimentar as gotículas aderidas nas paredes

dos poços. Foi adicionado a cada poço 1 uL de EDTA 125 mM pH 8,0 e 1 uL de acetato de sódio 3 M pH 8,0, seguido pela adição de 25 uL de etanol absoluto (Merck), agitação leve e incubação por 15 minutos no escuro e em temperatura ambiente. Decorrido o tempo, a placa foi centrifugada a 4000 rpm por 30 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado por inversão. A placa foi então centrifugada invertida por 10 segundos a 650 rpm. A etapa de precipitação foi finalizada a partir da adição de 35 uL de etanol 70% gelado (Merck) seguido por centrifugação a 4000 rpm por 20 minutos a 4°C, descarte do sobrenadante e centrifugação invertida 10 segundos a 650 rpm. Os precipitados do sequenciamento foram secos a 95°C por 20 minutos e ressuspendidos em 13 µL de formamida Hi-Di (Applied Biosystems) seguido por desnaturação a 95°C por 3 minutos. A solução obtida foi então utilizada para eletroforese no analisador automático de DNA, o sequenciador automático ABI Prism modelo 3130XL (Applied Biosystems).

As sequências obtidas foram analisadas utilizando o software de análise de sequenciamento CLC Main Workbench 5.0.2. (CLC bio). O programa alinha as sequências obtidas com as sequências referências de cada fragmento gênico de maneira a permitir uma análise comparativa que aponta conflitos entre as leituras. Estas sequências referências foram obtidas da base de dados NCBI Reference Sequence (RefSeq), mantido pelo NCBI/NIH (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/>). Para o estudo foi utilizada a sequência referência NM_000546.4. Para cada sequência obtida foram avaliados os éxons e junção éxon-íntron.

3.2.5 Detecção de alterações genômicas (SNPs e CNVs)

O perfil de alterações genômicas foi avaliado utilizando-se a metodologia de *CytoScan* HD Array (Affymetrix, Santa Clara, CA, EUA). Para esse ensaio, foram utilizadas sete amostras tumorais, sendo três de pacientes com a mutação p.R337H e quatro negativas para essa mutação. Esta plataforma de microarranjos de alta densidade apresenta mais de 2,6 milhões de sondas, incluindo 1,9 milhões de sondas não-polimórficas (para avaliar as Copy number variations (CNVs) e 750 mil sondas polimórficas ou de SNPs (para determinação alélica). O espaçamento médio entre cada sonda não polimórfica é 2 Kb e há uma sonda a cada 400 pares de base em regiões alvo. O espaçamento médio das sondas de SNPs é de 200 por megabase. As sondas têm um tamanho de 25 pares de bases. A plataforma usada neste estudo permite detectar ganhos e perdas genômicas a partir de 25-50 kb e corroborar os resultados com os dados de SNPs. Adicionalmente, as sondas de SNPs também permitem a detecção de regiões com mosaicismos e regiões de cnLOH. Todos os ensaios foram realizados de acordo com o protocolo padrão do fabricante.

Resumidamente, 250 ng do gDNA foi digerido com a enzima de restrição *NspI*, ligado a adaptadores específicos e amplificado pela PCR com a enzima Titanium Taq DNA polimerase (Clontech, Mountain View, CA, USA). O produto da reação foi visualizado em gel de agarose 2% (fragmentos entre 150 e 2000 pb). O material amplificado foi purificado utilizando-se beads magnéticas e quantificado em NanoDrop® ND1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA). A concentração desejada

deve ser superior a 2,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Posteriormente, o DNA purificado foi fragmentado com a enzima DNaseI, visualizado em gel de agarose 4% (fragmentos entre 25 e 125 pb) e marcado com biotina. O DNA marcado foi hibridado por 16-18h a 50°C no GeneChip® Hybridization Oven 645 (Affymetrix), lavado e corado no GeneChip® Fluidics Station 450 (Affymetrix) e escaneado no GeneChip® Scanner 3000 7G (Affymetrix). Os dados foram gerados utilizando-se o Affymetrix® GeneChip® Command Console® Software (AGCC) 4.0 e analisados com o Chromosome Analysis Suite v2.1 (ChAS) (Affymetrix). As alterações genômicas incluindo perdas, ganhos, mosaicismos e cnLOH foram avaliadas pelo programa Chromosome Analysis Suite v2.1 - ChAS (Affymetrix, Santa Clara, CA, EUA). Foi realizada a comparação dos achados com as alterações depositadas no Affymetrix Database of Variants (aDGV) e no Database of Genomic Variants (DGV) (<http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>).

O *software* utiliza o modelo de Hidden Markov (HMM) e o método linear robusto Bayesiano com distância de Mahalanobis (BRLMM-p) para estimar as CNVs e os genótipos, respectivamente. Regiões com mosaicismo (>5 Mb) foram determinadas utilizando a média dos log₂ ratio. Regiões com cnLOH foram calculadas com base nas sondas de SNPs e reportadas apenas aquelas com tamanho maior do que 5 Mb. Na análise das CNVs foram considerados os ganhos com o mínimo de 50 sondas consecutivas e as perdas com o mínimo de 25 sondas consecutivas

3.2.6 Sequenciamento Total do Genoma

O sequenciamento de alto desempenho foi realizado no New York Genome Center, New York, EUA. A biblioteca do DNA das amostras normais e tumorais foram preparados utilizando TruSeqDNA PCR-Free (Illumina) e sequenciado no Illumina HiSeq X utilizando leituras de 2x150pb. A cobertura de leitura foi de 100X por amostra tumoral e 40X por amostra normal.

3.2.6.1 Processamento dos dados

Antes de realizar a chamada das variantes, os resultados do sequenciamento do tumor e tecido normal foram processados utilizando o guia de “boas práticas” (*The Broad “best practices” pipeline*), o qual inclui o alinhamento das *reads* para o genoma humano de referência GRCh37 utilizando a ferramenta *Burrows Wheeler Aligner* (BWA) (LI e DURBIN 2009). Após o alinhamento, as sequências foram ordenadas para a retirada dos *reads* duplicados, que são compostos por uma série de fragmentos que se iniciam e terminam exatamente na mesma base. Os *reads* duplicados podem ocorrer em consequência da amplificação pela PCR realizada durante o preparo das bibliotecas, fragmentação do DNA no mesmo local, artefatos devido a regiões repetitivas e *background* na detecção de *clusters* na fase do sequenciamento. Esta etapa é necessária para que a cobertura das regiões genômicas não seja superestimada e não haja impacto na eficiência de detecção das variantes. Para esta etapa foi utilizado o programa PICARD v.1.101 (<http://broadinstitute.github.io/picard/>).

Em seguida à obtenção dos *reads*, o conjunto de sequências foi nomeado de acordo com sua origem, etapa necessária para entrada no programa GATK (do inglês: *Genome Analysis Toolkit*) (MCKENNA et al. 2010). Foi então utilizada a ferramenta PICARD para analisar a concordância entre as amostras T e N.

3.2.6.2 Identificação de SNVs e *Indels*

As *Single Nucleotide Variants* (SNVs) foram identificadas por muTect (CIBULSKIS et al. 2013), Strelka (SAUNDERS et al. 2012) e LoFreq (WILM et al. 2012). Da mesma forma, inserções e deleções (*indels*) foram identificadas por Strelka, versões somáticas de Pindel (YE et al. 2009) e Scalpel (NARZISI et al. 2014). As variantes foram anotadas de acordo com o seu efeito (não-sinônima, *nonsense*, etc) utilizando o programa snpEff (CINGOLANI et al. 2012). As variantes foram anotadas ainda com a utilização das ferramentas snpSift, e GATK *Variant Annotator* com informações do COSMIC (FORBES et al. 2016), 1000 Genomas, ExAC, CIViC (disponível em: <https://civic.genome.wustl.edu>) e UniProt (disponível em: <https://uniprot.org>), considerando o *Minor Allele Frequency* (MAF) >0,25.

A anotação das variantes foi realizada de acordo com os bancos de dados *Ensemble Gene* (Ensemble Database). O fluxograma descrevendo as etapas realizadas no estudo está representado na Figura 4.

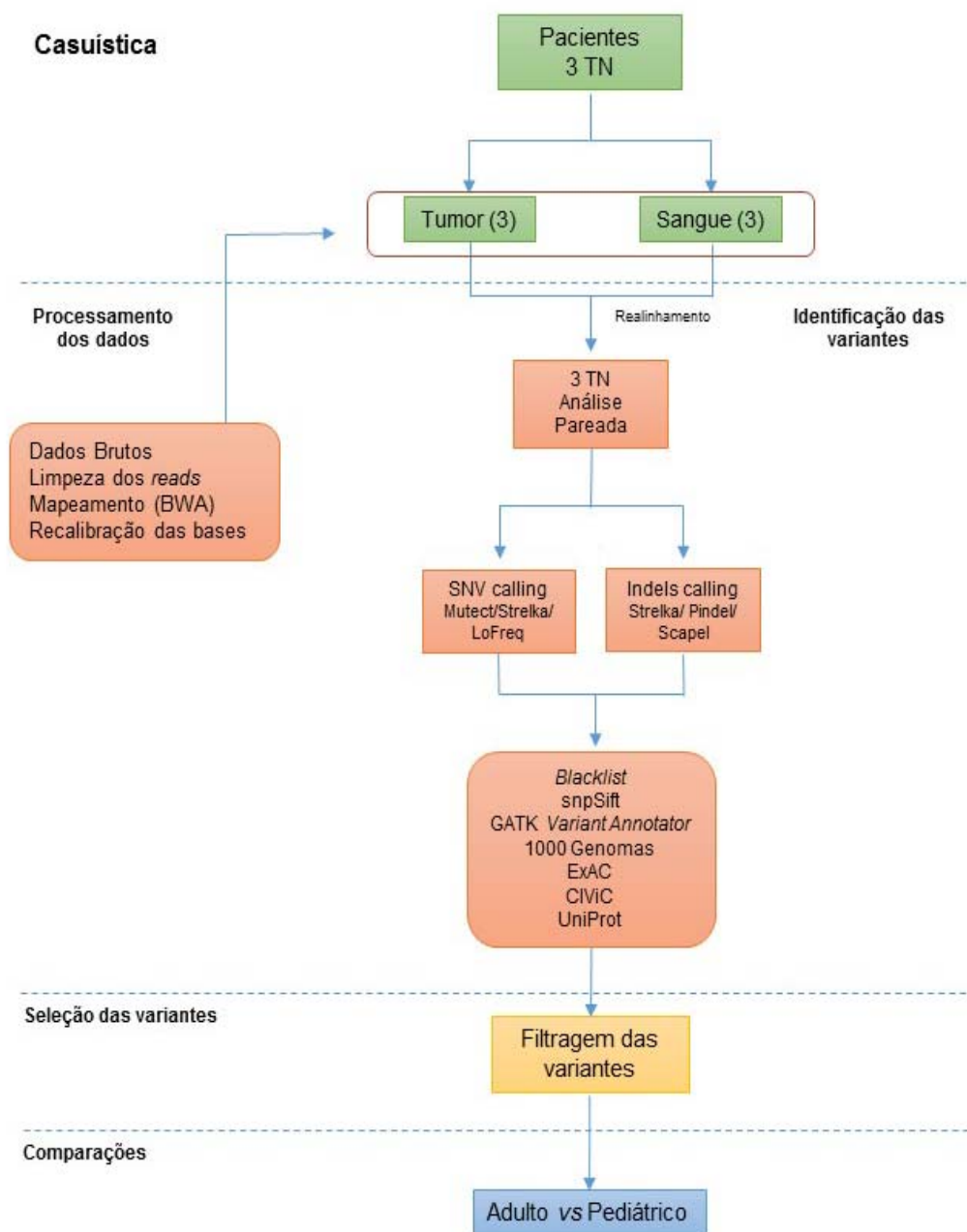


Figura 4 - Fluxograma das etapas realizadas para análise do sequenciamento do genoma nos pacientes diagnosticados com ADR.

Foi realizada a comparação entre amostras tumorais (T) e normais (N) pareadas, selecionando apenas variantes exclusivas do tumor de cada paciente. A comparação entre N e T é uma estratégia válida para a

identificação de variantes genéticas e candidatos a *drivers* (JONES et al. 2015).

Após a seleção das variantes exclusivas em amostras tumorais, foram feitas comparações entre grupos de pacientes de acordo com a faixa etária ao diagnóstico. As variantes germinativas dos três casos de ADR foram comparadas na plataforma *Ingenuity Variant Analysis* (IVA) (QIAGEN Valencia, CA, EUA). A análise foi construída com os seguintes parâmetros: (1) delineamento da análise: doença genética, cujo objetivo é identificar variantes de interesse com base em trios, famílias ou modelos de caso-controle; (2) termos biológicos inseridos: *cancer*, *Li-Fraumeni syndrome associated cancer*, *adrenocortical carcinoma*; (3) foram mantidas apenas as variantes em regiões exônicas; (4) foram excluídas as variantes com uma frequência acima de 1% em bancos de dados públicos de sequenciamento (1000 genomas, ExAC ou gnomAD); (5) *genotype call quality* de no mínimo 30.

4 RESULTADOS

Os resultados obtidos neste estudo foram realizados em três etapas. Na primeira etapa, foi realizado um levantamento epidemiológico de todos os pacientes que desenvolveram ADR nos Estados Unidos. Na segunda etapa foi realizada a análise do perfil de alterações genômicas em tumores ADR de pacientes com e sem a mutação p.R337H. Na terceira etapa foram analisados dados do sequenciamento do genoma de pacientes com mutação p.R337H que desenvolveram carcinoma adrenocortical na infância e na fase adulta.

4.1 ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO COM BASE NO SEER

4.1.1 Descrição dos casos de ADR nos Estados Unidos

No período de 1973 a 2014 foram diagnosticados 2014 casos de carcinomas adrenocorticais. Na distribuição de casos por gênero, houve uma maior proporção de indivíduos do sexo feminino de 1.3:1. Aproximadamente 78% (1567/2014) dos casos foram diagnosticados em idade superior a 40 anos e 6,5% (131/2014) deles ocorreram na infância. A maioria dos pacientes era caucasiano (n=1736; 86,2%) e foi tratado por ressecção cirúrgica (n=1482, 73,6%) (Tabela 1).

Aproximadamente 80% dos casos não tinham informação disponível do estadiamento tumoral. Entre os 419 casos que possuíam essa informação, cerca de 65% apresentaram estadiamento III e IV (Tabela 1).

Tabela 1 - Características clínicas e demográficas da coorte de 2014. Casos de carcinomas adrenocorticais no SEER 18 coletados, período de 1973 a 2014.

Variáveis		N	% Total
Gênero	Masculino	861	42,8
	Feminino	1153	57,2
Faixa etária (em anos)	00-19	131	6,5
	20-39	316	15,7
	40-59	778	38,6
	60-85+	789	39,2
Raça	Branco	1736	86,2
	Negro	142	7,1
	Outros	132	6,5
	ND	4	0,2
Tamanho do tumor	≤10cm	431	21,5
	>10cm	466	23
	ND	1117	55,5
Lateralidade	Direito	874	43,4
	Esquerdo	1040	51,6
	Bilateral	20	1,0
	ND	80	4,0
Estadiamento	I	62	3,1
	II	82	4,1
	III	161	8,0
	IV	114	5,6
	ND	1595	79,2
Cirurgia	Sim	1482	73,6
	Não	495	24,6
	ND	37	1,8

Legenda: ND: Não disponível. * Outros:(índio americano / nascido no Alasca, asiático/ nascido nas ilhas do pacífico).

Dentre todos os casos, os estados com o maior número de registros dessa neoplasia foram a Califórnia (758/2014), seguido do estado da Geórgia (182/2014) e Iowa (138/2014) (Figura 5).



Figura 5 - Distribuição geográfica dos casos de ADR diagnosticados nos EUA no período de 1973 a 2014.

4.1.2 Taxas padronizadas

A taxa de incidência padronizada por idade foi de 0,6 (1973) e 1,0 (2014) por 1.000.000 homens e de 0,6 (1973) e 1,0 (2014) por 1.000.000 mulheres. A tendência da incidência apresentou estabilidade, em ambos os sexos (Tabela 2, Figura 6).

Tabela 2 - Taxas de incidência padronizadas por idade e tendência de ADR, segundo o gênero, nos Estados Unidos, no período de 1973 a 2014.

	Incidência	Masculino	Feminino
Taxa	1973	0,6	0,6
	2014	1,0	1,0
	AAPC (IC95%)	0,1 (-0,8;1,0)	0,7 (-2,1;3,6)

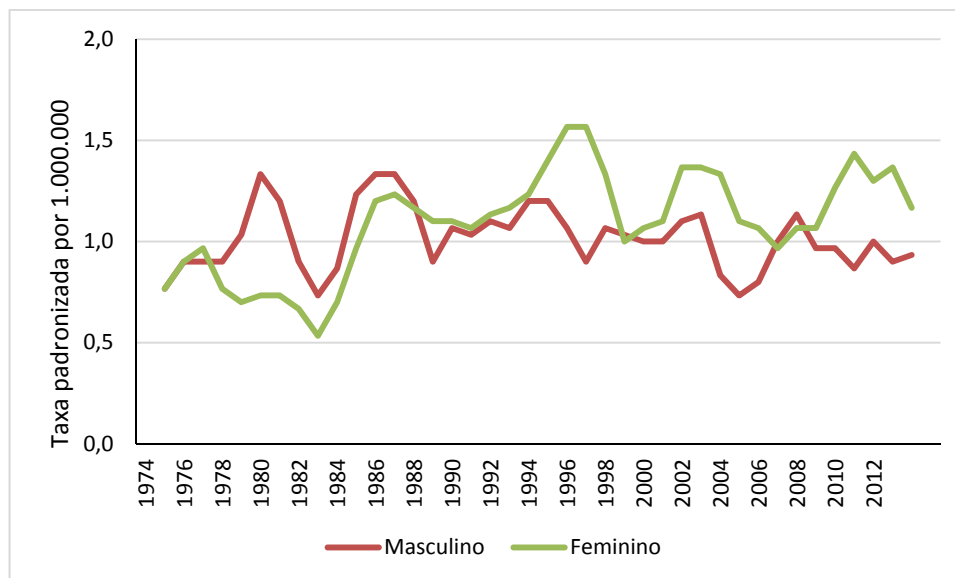
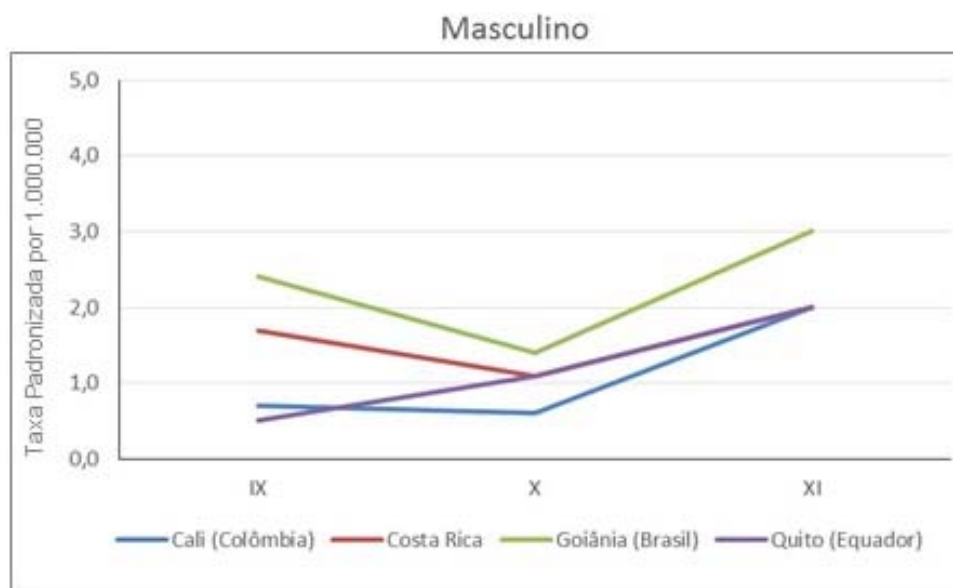


Figura 6 - Taxas de incidência padronizada por idade de diagnóstico do ADR, segundo o gênero. SEER (18) 1973 - 2014. Nota: Alisado por três anos.

Para os quatro Registros de Câncer de Base Populacional da América Latina (Colômbia, Costa Rica, Brasil e Equador), as maiores taxas de incidência do ADR, em ambos os sexos foram observadas em Goiânia, com taxas de 2,4; 1,4 e 3,0 por 1.000.000 para homens e 3,5; 3,8 e 4,0 por 1.000.000 para mulheres. As menores taxas para os homens foram observadas em Cali, com taxas de 0,7; 0,6 e 2,0 por 1.000.000 e em Quito para as mulheres 0,8; 2,0 e 1,0 (Figura 7).

A



B

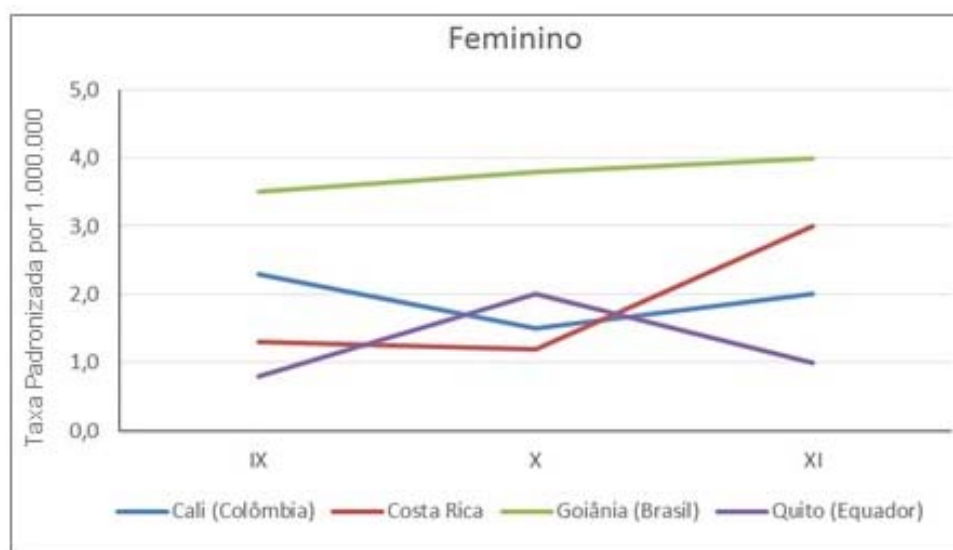


Figura 7 - Gráfico com as taxas brutas de incidência de ADR em Cali, Costa Rica, Goiânia e Quito. A: para o sexo masculino e B: para o sexo feminino. Dados obtidos nos volumes IX, X e XI da Incidência do Câncer em Cinco Continentes (CI5, IARC).

4.1.3 Modelo Idade-Período-Coorte

Frente à característica bimodal para idade presente nos tumores adrenocorticais, optou-se por avaliar o efeito APC em dois grupo: pediátricos (00-19 anos) e adultos (20-84 anos). As análises foram feitas por períodos de cinco anos de 1973 a 2014.

4.1.4 Pacientes pediátricos (0 a 19 anos)

A *Long Age Curve* é a taxa estimada para indivíduos nascidos na coorte de referência. Nesta análise, a coorte de referência é a do ano de 1985. Pode-se então observar o risco de desenvolvimento de ADR para as crianças que nasceram em 1985 até os 20 anos de idade.

As taxas foram mais altas em crianças de zero a cinco anos de idade tendo sido observado um aumento após os 15 anos (Figura 8 A e B). A taxa de coorte (Figura 8 C), principalmente entre nascidos em 1999, foi três vezes maiores em comparação com os outros anos. No entanto, apesar de ser um aumento considerável, a taxa é muito pequena e pode ser resultado de um efeito randômico. Portanto, consideramos que não houve efeito de coorte para este grupo (Figura 8 D).

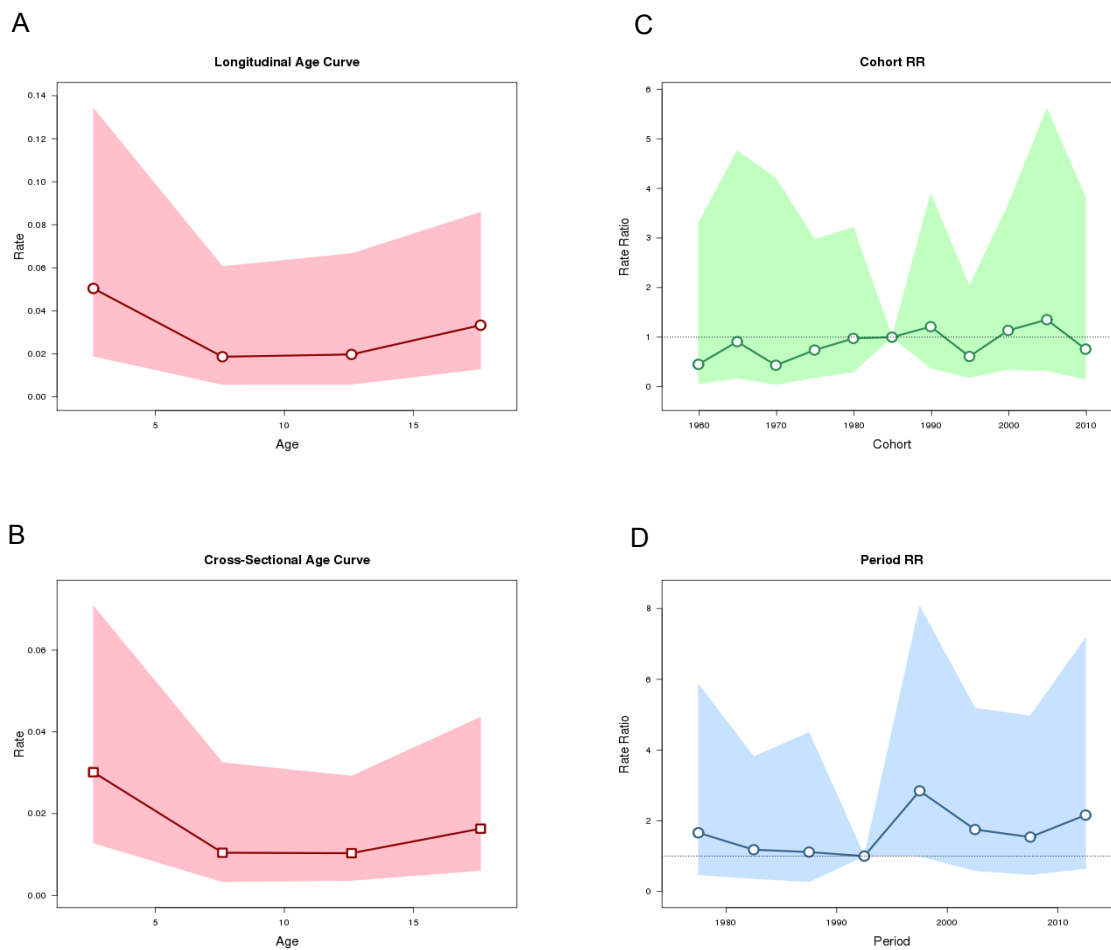


Figura 8 - Resultados das análises do efeito idade, período e coorte em pacientes com carcinoma adrenocortical na faixa etária de 0-19 anos. A e B: efeito da idade, C: efeito da coorte e D: efeito do período.

Ainda que seja possível observar o aumento da taxa de incidência em crianças de 5 a 9 anos, a análise do efeito do desvio local não apresentou diferença significativa. Embora a incidência de ADR seja maior entre crianças de 0-4 anos de idade, estas taxas têm aumentado em crianças entre 5 e 9 anos (Figura 9).

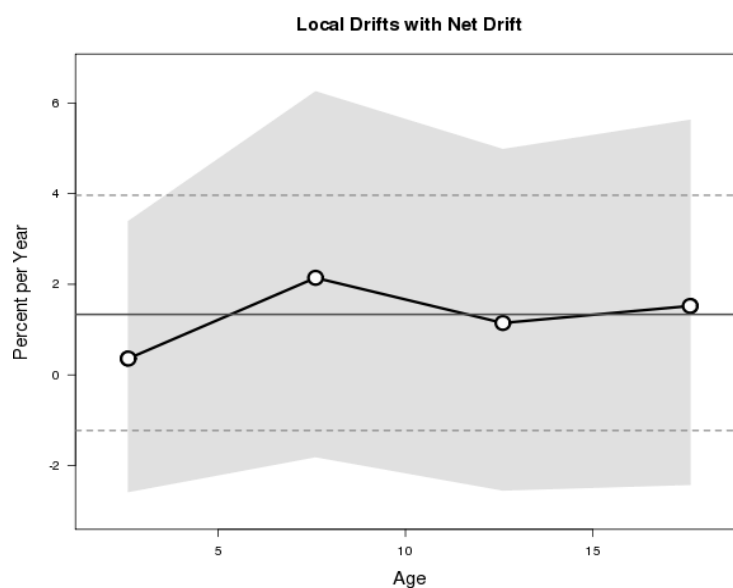


Figura 9 - Análise do efeito do desvio local em pacientes portadores de carcinoma adrenocortical na faixa etária de 0-19 anos.

4.1.5 Pacientes adultos (20 anos e mais)

As curvas por idade (*Long Age Curve* e *Cross Sectional Age Curve*) foram semelhantes neste caso e ambas mostraram que as taxas estão aumentando em torno de 0,3% por cem mil até os 65 anos. As taxas permaneceram estáveis com oscilação no período entre 1998 e 1999 (Figura 10).

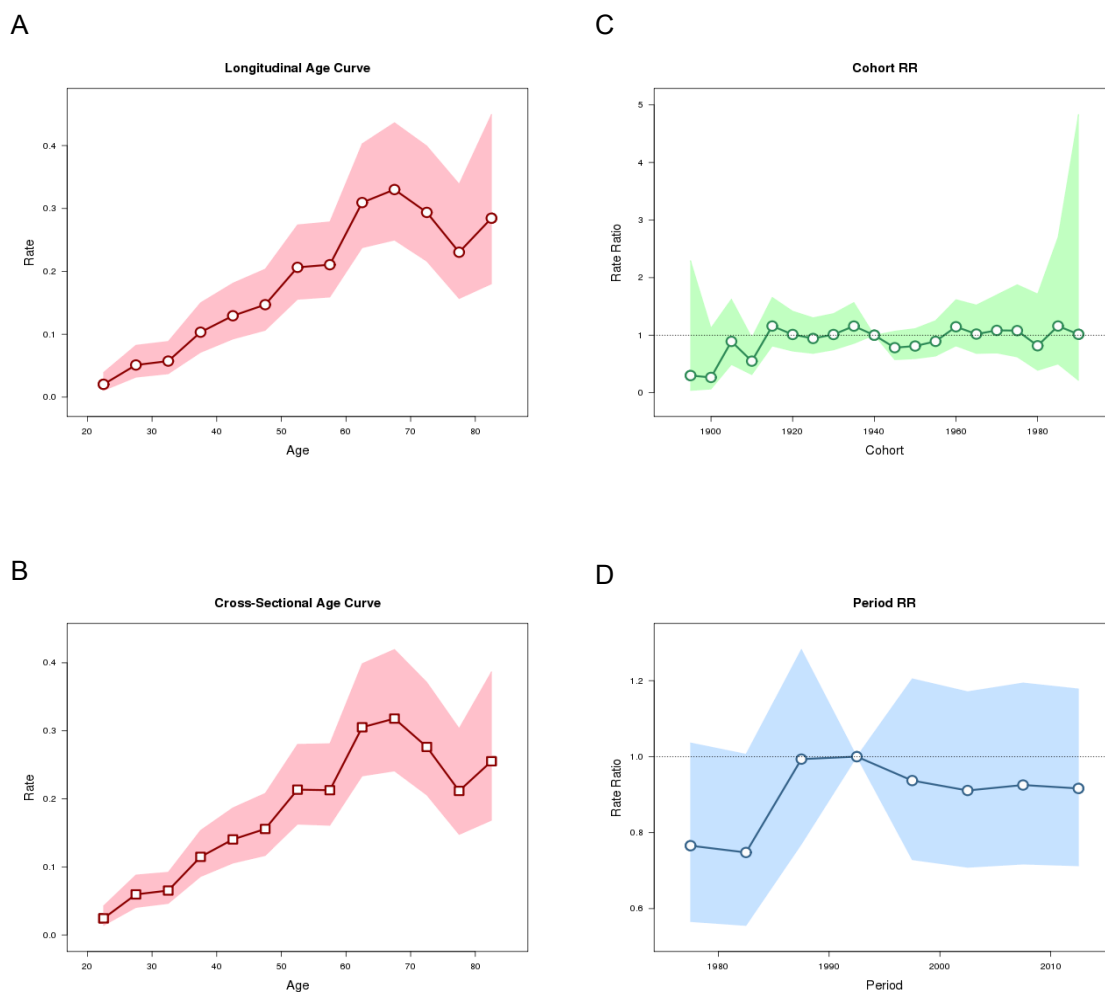


Figura 10 - Resultados das análises do efeito idade, período e coorte para pacientes com ADR na faixa etária de 20 a mais de 85 anos, de acordo com os dados obtidos no SEER 18. (A e B: efeito da idade, C: efeito da coorte e D: efeito do período).

A análise dos desvios locais dos pacientes adultos revelou que as faixas etárias mais jovens (até 38 anos) aumentaram em incidência. Em pacientes com idade superior a 70 anos, também notou-se o aumento das taxas. Entretanto, nas faixas etárias intermediárias, entre 40 e 65 anos, observou-se que as mesmas estavam abaixo de zero, ou seja, estavam diminuindo (Figura 11).

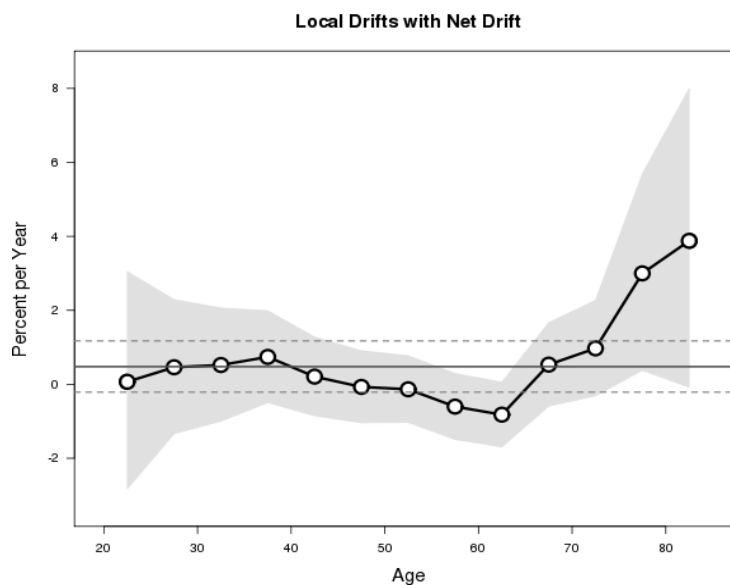


Figura 11 - Análise do efeito do desvio local em pacientes adultos.

4.1.6 Análises de sobrevida dos casos de ADR nos Estados Unidos

A probabilidade de sobrevida aos 5 anos foi 35,1%. Verificou-se diferença significativa ($p < 0,05$) para gênero, sendo maior no sexo feminino (37,2%). Segundo a faixa etária, foi observada melhor sobrevida em pacientes diagnosticados até os 19 anos (56,0%) e naqueles cuja a extensão da doença foi localizada (60,2%). Também houve melhora da sobrevida quanto à década de diagnóstico (valor de $p < 0,05$); em 1970 a sobrevida foi de 24,5% e nos anos 2000 de 36,0%. Não houve diferença segundo a raça (Tabela 3) (Figura 12).

Tabela 3 - Sobrevida global aos 60 meses de 1498 pacientes portadores de carcinoma ADR, entre 1973 a 2009, SEER 18, segundo características sociodemográficas e clínicas.

Variáveis	N	Óbitos	Sobrevida (60 meses)	Valor de p
Gênero				0,023
Feminino	844	527	37,2	
Masculino	654	439	32,5	
Faixa etária (em anos)				<0,001
00-19	94	41	56,0	
20-39	249	150	39,4	
40-59	588	345	40,9	
60 +	567	430	23,8	
Raça				0,371
Branco	1301	834	35,6	
Negro	101	71	29,7	
Outros*	93	60	33,4	
Extensão da doença				<0,001
Distante	333	312	5,8	
Localizado	409	162	60,2	
Regional	189	115	39,2	
Década de diagnóstico				0,046
1970	94	71	24,5	
1980	205	132	35,6	
1990	372	238	35,5	
2000	827	525	36,0	
Total	1498	966	35,1	-

Legenda: ND: Não disponível. * Outros: índio americano / nascido no Alasca, asiático / nascido nas ilhas do pacífico.

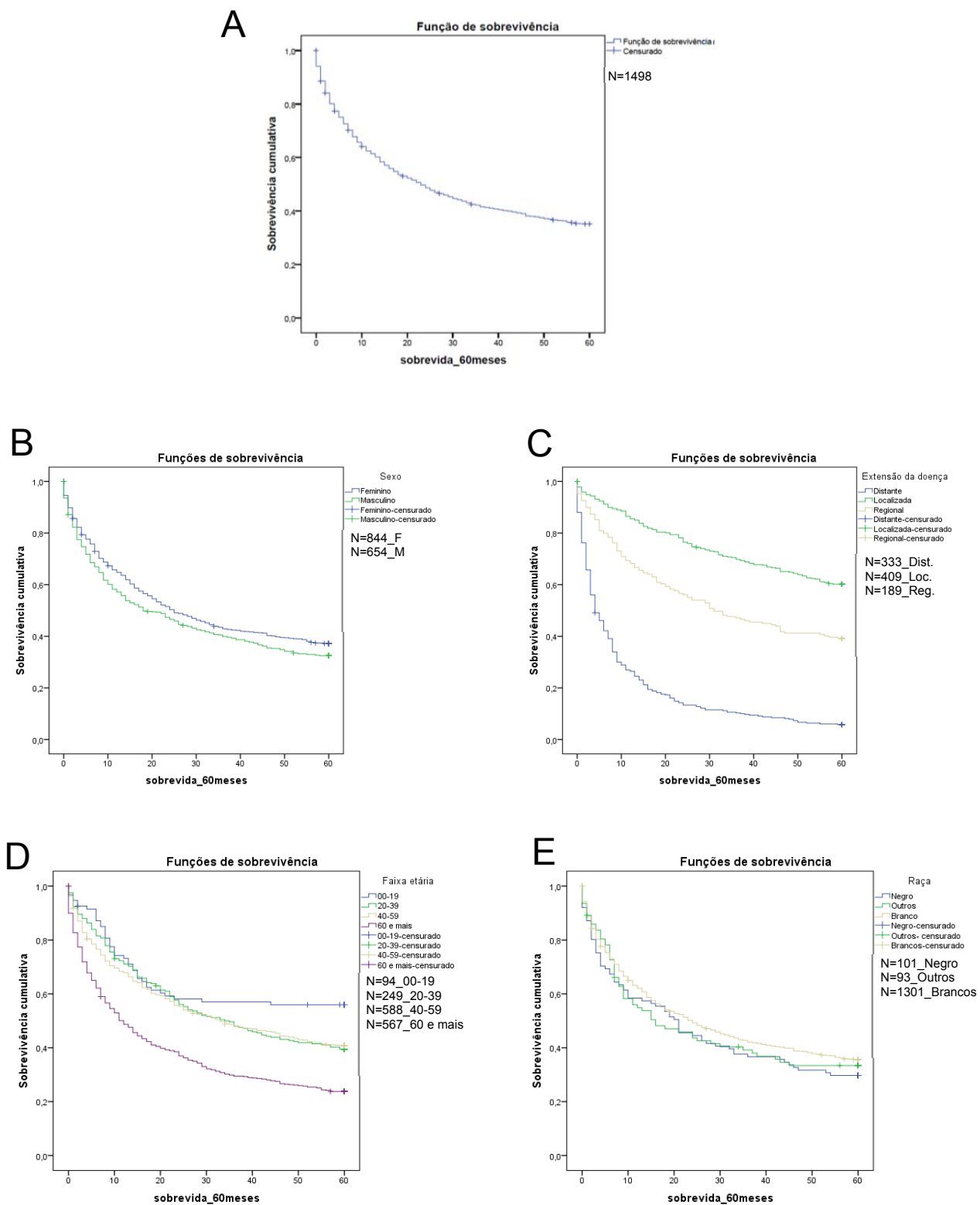


Figura 12 - Curvas de sobrevida Kaplan-Meier de pacientes com ADR, diagnosticados entre 1973 e 2009, em 18 registros americanos (SEER18). (A) sobrevida global, (B) por gênero, (C) por extensão da doença, (D) faixa etária e (E) por raça.

4.2 ANÁLISE DO PERFIL DE ALTERAÇÕES GENÔMICAS DOS PACIENTES LFS COM ADR

4.2.1 Seleção e caracterização das amostras

A idade média dos 37 pacientes incluídos neste estudo foi de 13,22 anos (variação 3 meses a 65 anos), sendo composta por 22 pacientes do sexo feminino e 15 do sexo masculino. Dentre os 37 pacientes, 29 eram pediátricos (3 meses a 17 anos) e 8 eram adultos (18 a 65 anos). A mediana de idade entre as pacientes do sexo feminino foi de 10,4 anos (variação 3 meses a 63 anos) e no sexo masculino foi de 17,1 anos (variação 9 meses a 65 anos).

4.2.2 Identificação da mutação *TP53* p.R337H

Após a extração e quantificação do DNA tumoral, as amostras foram analisadas por RFLP (do inglês: *Restriction Fragment Length Polymorphism*) para a identificação da presença de mutação no códon 337 do gene *TP53* (Figura 13). Posteriormente as amostras foram sequenciadas a fim de identificar outras possíveis mutações no gene *TP53* (Figura 14). Sete de 22 pacientes do sexo feminino eram negativas para a mutação p.R337H, 15 de 22 eram positivas para a mesma mutação e uma apresentou a mutação c.919+1G>A. Dentre os 15 pacientes do sexo masculino, seis eram negativos para a mutação p.R337H, oito positivos para esta alteração e um positivo para a mutação *TP53* p.R273L (c.818G>T).

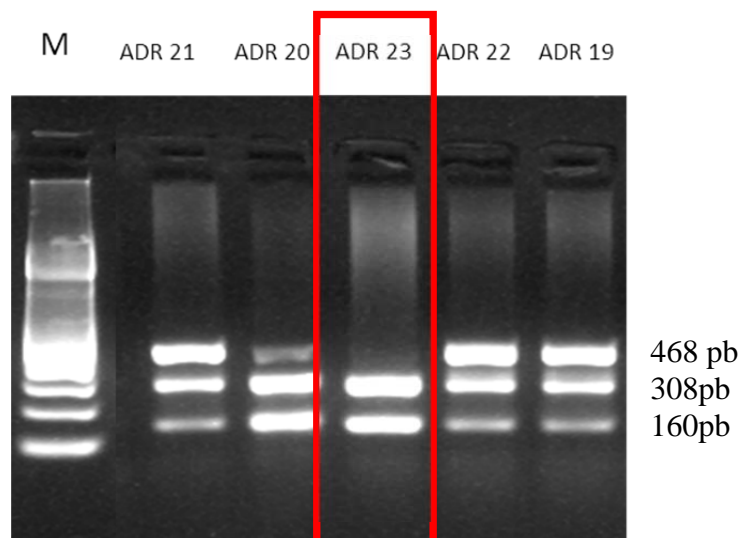


Figura 13 - Imagem representativa do resultado da análise de RFLP, onde quatro pacientes foram positivos para a mutação p.R337H (ADR 21, 20, 22 e 19). Em destaque (retângulo em vermelho), um caso negativo para a presença da mutação (ADR 23). (Homozigoto para o alelo G, não mutado). M= Marcador de peso molecular, *Ladder* 1kb Plus, pb= Pares de bases.

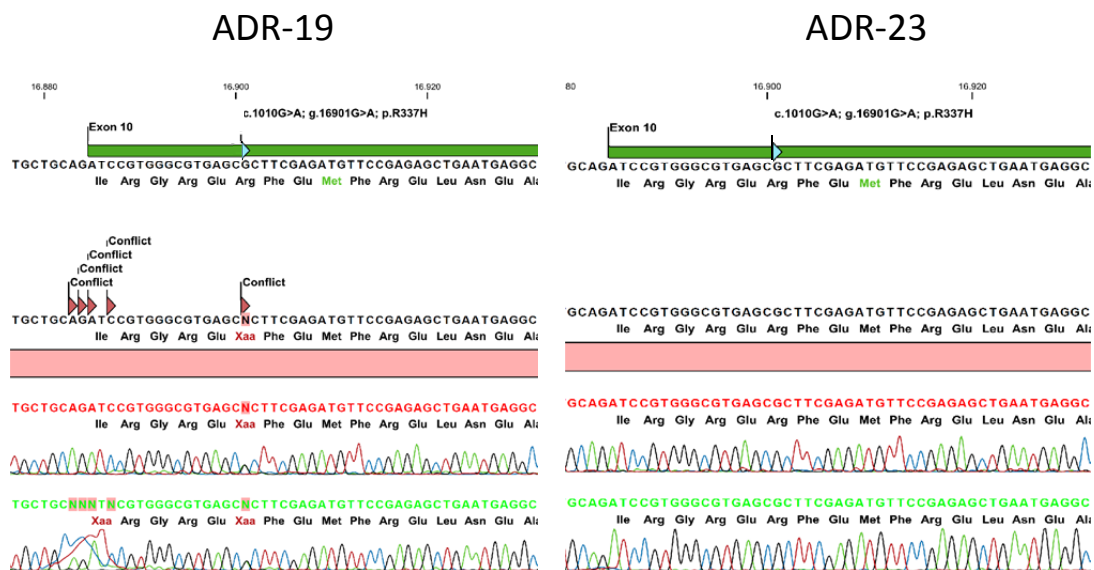


Figura 14 - Eletroferogramas resultantes do sequenciamento de Sanger para o gene *TP53*. O caso ADR19 é positivo para a mutação p.R337H e o caso ADR 23 é negativo para esta mutação.

Tabela 4 - Resultado da investigação da mutação p.R337H nos pacientes com ADR.

ID	Sexo	p.R337H Tumor	Mutação germinativa <i>TP53</i>
ADR-1	M	(+)	c.1010 G>A p.R337H
ADR-2	F	(-)	ND
ADR-3	F	(+)	c.1010 G>A p.R337H
ADR-4	F	(+)	c.1010 G>A p.R337H
ADR-5	F	(+)	c.1010 G>A p.R337H
ADR-6	F	(+)	c.1010 G>A p.R337H
ADR-7	M	(+)	c.1010 G>A p.R337H
ADR-8	M	(-)	(-)
ADR-9	F	(+)	c.1010 G>A p.R337H
ADR-10	M	(+)	c.1010 G>A p.R337H
ADR-11	F	(+)	c.1010 G>A p.R337H
ADR-12	F	(+)	c.1010 G>A p.R337H
ADR-13	M	(+)	c.1010 G>A p.R337H
ADR-14	M	(+)	ND
ADR-15	M	(+)	c.1010 G>A p.R337H
ADR-16	F	(+)	c.1010 G>A p.R337H
ADR-17	F	(+)	c.1010 G>A p.R337H
ADR-18	F	(+)	ND
ADR-19	M	(+)	ND
ADR-20	F	(+)	ND
ADR-21	F	(+)	c.1010 G>A p.R337H
ADR-22	M	(+)	ND
ADR-23	M	(-)	ND
ADR-24	F	(-)	ND
ADR-25	F	(-)	ND
ADR-26	M	(-)	c.818G>T p.R273L
ADR-27	F	(-)	c.919+1G>A
ADR-28	M	(-)	ND
ADR-29	F	(-)	(-)
ADR-30	F	(+)	ND
ADR-31	F	(+)	c.1010 G>A p.R337H
ADR-32	M	(+)	c.1010 G>A p.R337H
ADR-33	F	(+)	ND
ADR-34	M	(-)	(-)
ADR-35	M	(-)	(-)
ADR-36	F	(-)	ND
ADR-37	F	(-)	(-)

Legenda: F: Feminino, M: Masculino, (+) Positivo, (-) Negativo, ND: Não disponível

4.2.3 Análise de alterações genômicas

Vinte e dois dos 37 casos incluídos no estudo apresentavam tecido com quantidade suficiente para a realização dos experimentos genômicos. Embora o protocolo utilizado seja específico para amostras FFPE e tenha sido seguido todas as recomendações do fabricante (Affymetrix, CA), foi obtida uma baixa taxa de sucesso explicada pela qualidade do DNA obtido desses casos.

Entre as 22 amostras testadas inicialmente, 12 passaram pelo controle de qualidade para a hibridação nos chips (Affymetrix, CA). Destes, apenas sete tumores apresentaram resultados com qualidade satisfatória para as análises.

A análise de SNP arrays foi realizada nos tumores ADR-7, ADR-14 e ADR-17 portadores da mutação p.R337H e nos casos ADR-23, ADR-35, ADR-36 e ADR-37 negativos para mutações, sendo que os casos ADR-14, ADR-23 e ADR-36, não tinham amostra disponível para que fosse realizada a investigação de mutações germinativas no gene *TP53*. Para os outros casos a presença ou ausência de mutações nesse gene foram testadas tanto no tumor quanto no sangue periférico.

Quatro pacientes são do sexo masculino e três do sexo feminino e a idade mediana dos pacientes foi de 4,8 anos (variação de 1-11 anos). A Tabela 5 mostra o número e o tipo de alteração por paciente.

Tabela 5 - Número total de alterações genômicas detectadas por indivíduo analisado.

Grupo	Caso	Tipo	Número		Número		Número de alterações
			de alterações	Tipo	de alterações	Tipo	
Negativos para p.R337H	ADR-23	Ganho	103	cnLOH	12	Perda	25
	ADR-35	Ganho	160	cnLOH	20	Perda	22
	ADR-36	Ganho	19	cnLOH	7	Perda	0
	ADR-37	Ganho	44	cnLOH	24	Perda	33
Total			326		63		80
Positivos para p.R337H	ADR-7	Ganho	21	cnLOH	10	Perda	5
	ADR-14	Ganho	103	cnLOH	15	Perda	9
	ADR-17	Ganho	3	cnLOH	2	Perda	7
	Total			127		27	

Notavelmente, aproximadamente 73% (469/644) das alterações estavam presentes nos casos negativos para a mutação p.R337H com uma média de 117 alterações por caso. Já os casos positivos apresentaram uma média de 59 alterações por caso.

A Figura 15 sumariza as alterações distribuídas ao longo dos cromossomos dos sete casos avaliados neste estudo. De forma geral, foram observadas alterações em quase todos os cromossomos (Figura 16). As alterações mais frequentes foram ganhos dos cromossomos 8 e 12 e perdas dos cromossomos 11 e 17.

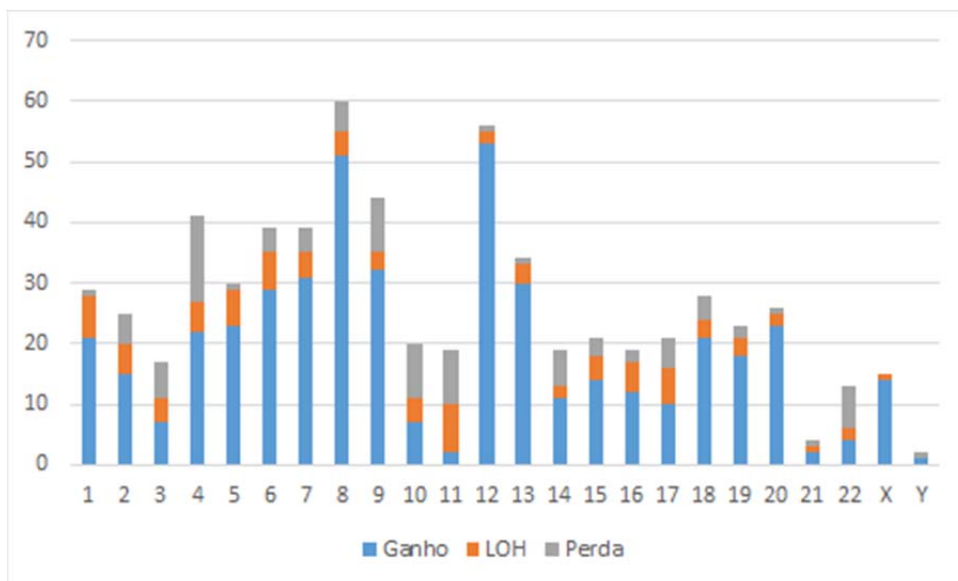


Figura 15 - Alterações genômicas distribuídas ao longo dos cromossomos em sete casos de ADR avaliados para alterações genômicas (*CytoScan HD*, *Affymetrix*).

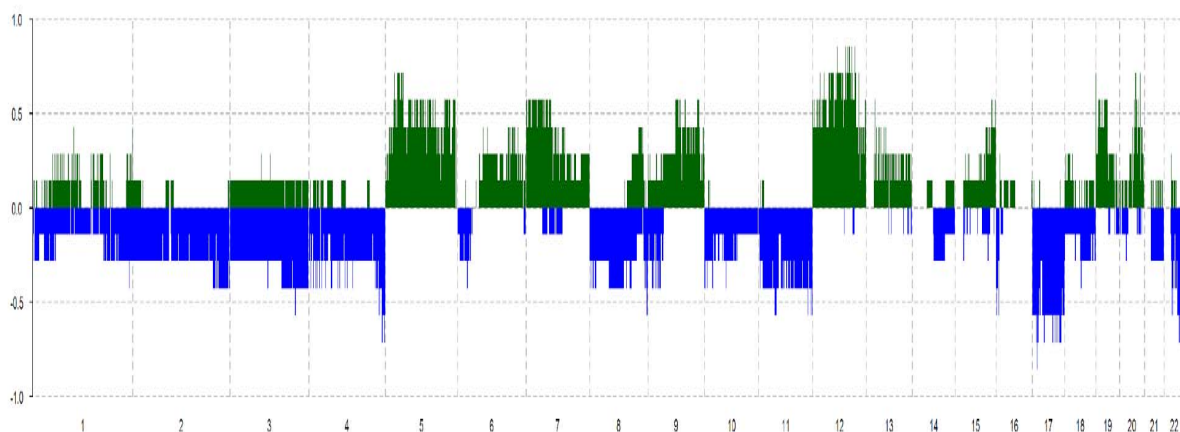


Figura 16 - Distribuição das alterações genômicas detectadas em sete carcinomas adrenocorticais pediátricos. Verde: ganhos; Azul: perdas. O eixo y representa a frequência das alterações, onde 1.0 e -1.0 representam 100% dos casos.

4.2.4 Alterações presentes nos casos positivos para a mutação p.R337H

O perfil global de alterações genômicas encontrado nos pacientes positivos para mutação *TP53* p.R337H (ADR-7, ADR-14 e ADR-17) está ilustrado na Figura 17. Todos os casos apresentaram alterações nos cromossomos (chr) 1, 7, 11, 15 e 17 e englobavam praticamente o cromossomo todo. Todos os casos apresentaram ganhos no cromossomo 1 e em dois casos foi observado cnLOH em 1p36-q44 (ADR-7) e no caso ADR-14 foi observada cnLOH em todo o cromossomo 1. Além disso, o caso ADR-14 apresentou um alto número de alterações nos cromossomos 8 e 12.

Na Figura 18 é possível observar todas as alterações genômicas distribuídas ao longo dos cromossomos nos casos positivos para a mutação p.R337H.

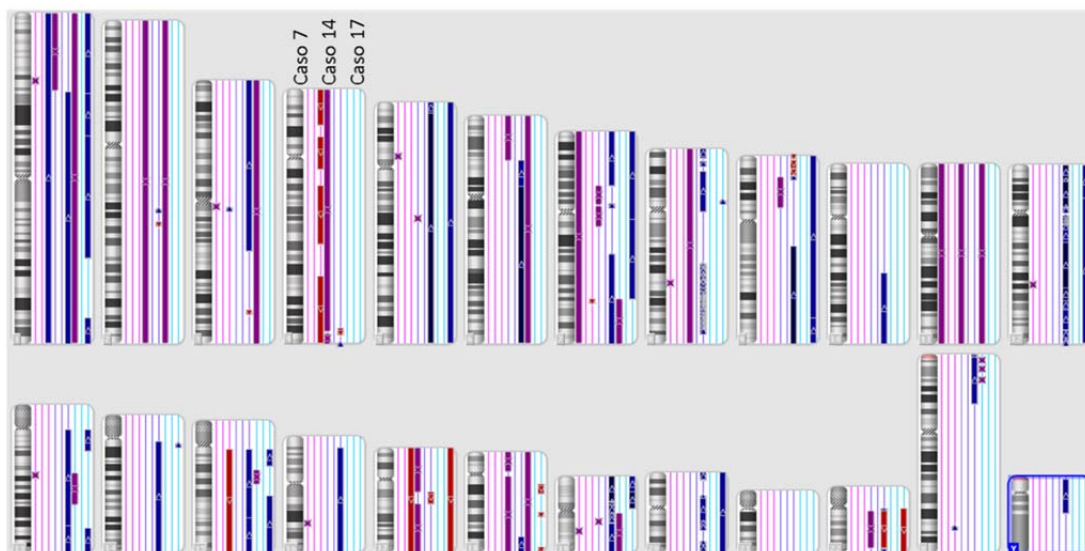


Figura 17 - Perfil global de alterações em pacientes positivos para a mutação p.R337H no gene *TP53*. Barras azuis representam ganhos; vermelhas, perdas e barras roxas representam *cnLOH*.

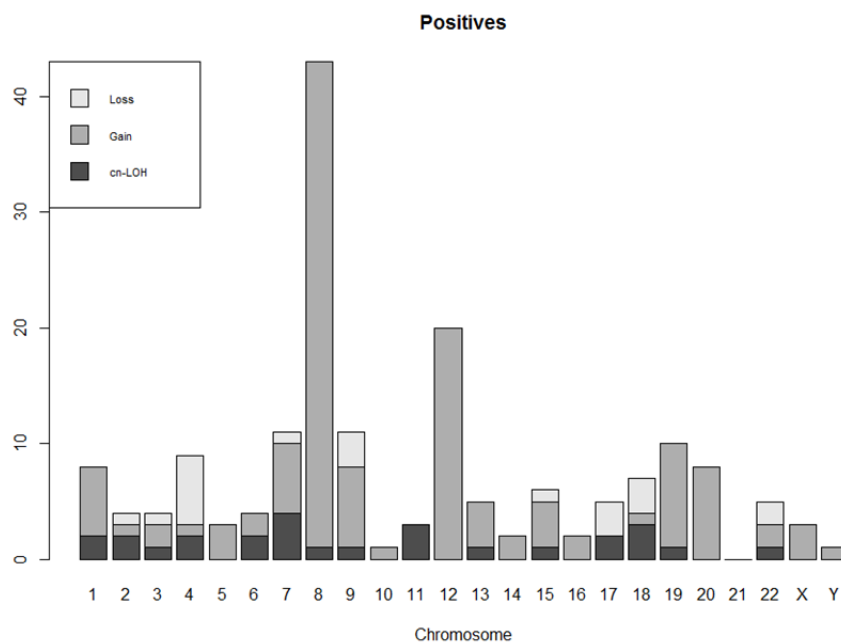


Figura 18 - Alterações genômicas nos casos positivos para a mutação p.R337H distribuídas ao longo dos cromossomos.

As três amostras positivas para mutações no gene pR337H *TP53* apresentaram seis alterações em todos os casos. Identificou-se quatro regiões com ganho no cromossomo 1 (Tabela 6), englobando quase todo o cromossomo e contendo mais de 10 mil segmentos genômicos. Outro cromossomo completamente alterado em todos estes casos foi o cromossomo 11, o qual apresentou cnLOH sem alteração no número de cópias em 11p15.5-q25.

A perda da região cromossômica 17p13.3-q25.3 (start: 34071799 - end: 42761941), que engloba diversos genes, destacando o *BRCA1* e a *TOP2A*, foi também observada como alterada em todos os casos positivos para pR337H. Além disso, um dos casos (ADR-14) apresentou uma cnLOH envolvendo todo o cromossomo 17. Sendo assim, os três casos apresentaram alterações ao longo de todo o cromossomo 17.

Tabela 6 - Regiões com alterações compartilhadas entre os casos positivos para a mutação p.R337H no gene *TP53*.

Chr	Início	Fim	Tamanho (pb)	Nº de Genes	ADR-7	ADR-14	ADR-17
1	60070064	61081379	1011315	173	cnLOH/ Ganho	Ganho	Ganho
1	61086651	92971922	31885271	5575	cnLOH/ Ganho	Ganho	Ganho
1	92973761	184735330	91761569	5453	cnLOH/ Ganho	Ganho	Ganho
1	229888219	249224684	19336465	412	cnLOH/ Ganho	Ganho	Ganho
11	198509	134942626	134744117	3200	cnLOH	cnLOH	cnLOH
17	34071799	42761941	8690142	456	Perda	Perda	Perda

Legenda: Chr: cromossomo. ADR-7, ADR-14, ADR 17: Caso adrenocortical 7, 14 e 17, respectivamente.

Foram identificadas alterações exclusivas nos casos positivos para a mutação p.R337H. Os casos ADR-7 e ADR-17 apresentaram ganhos em 1p36.33 (start: 849466 - end: 882802), incluindo os genes *SAMD11*, *NOC2L* e *non-coding RNA LOC100130417*. Os dois tumores apresentaram também perda em 17p13.3 (start: 525- end: 18900) onde se mapeia o gene *DOC2BL*.

Os casos ADR-7 e ADR-14 compartilharam uma cnLOH em 18q23 (start: 78014123 - end: 78014582) (Tabela 7); entretanto, essa alteração não contém genes conhecidos. O caso ADR-14 apresentou um ganho em 3p26.3 (start: 61891- end: 62613; sem gene conhecido), enquanto que o caso ADR-17 teve um ganho em Xq26.3.

Tabela 7 - Alterações identificadas exclusivamente em pelo menos dois pacientes positivos para a mutação p.R337H.

Chr	Início	Fim	Tamanho (pb)	Genes	ADR-7	ADR-14	ADR-17
				LOC100130417			
1	849466	882802	33336	<i>SAMD11</i> <i>NOC2L</i>	Ganho	-	Ganho
17	606	18900	18294	<i>DOC2BL</i>	Perda	-	Perda
18	78014123	78014582	459	-	cnLOH	cnLOH	-

Legenda: Chr: cromossomo. ADR-7, ADR-14, ADR 17: Caso adrenocortical 7, 14 e 17, respectivamente.

4.2.5 Alterações presentes nos casos negativos para a mutação p.R337H

O perfil global de alterações dos quatro casos negativos para a mutação p.R337H (ADR-23, ADR-35, ADR-36 e ADR-37) pode ser observado na Figura 19. A Figura 20 representa a distribuição de todas as alterações encontradas nos casos negativos ao longo dos cromossomos.

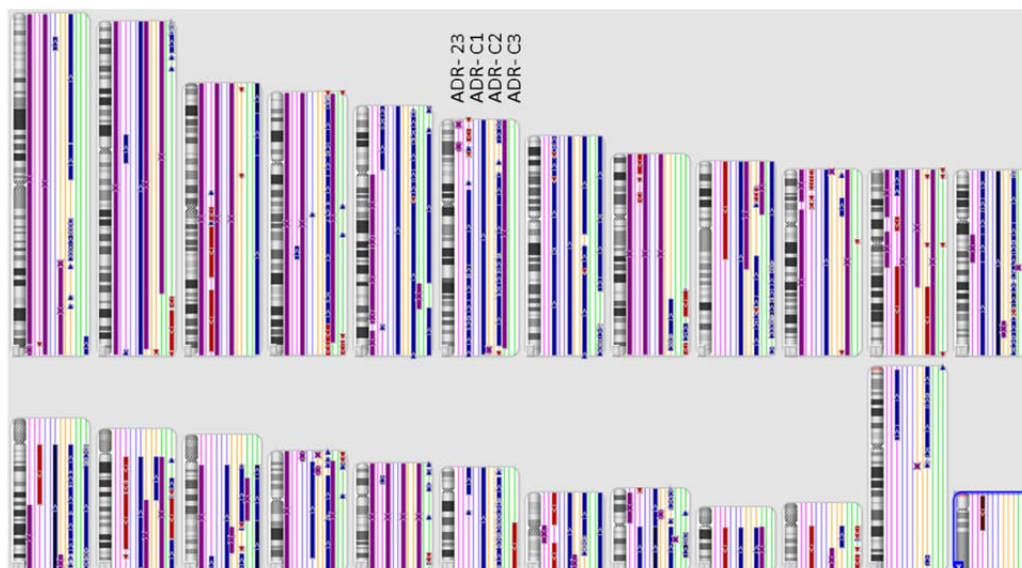


Figura 19 - Perfil global de alterações em pacientes negativos para a mutação p.R337H no gene *TP53*. Barras azuis representam ganhos; vermelhas, indicam perdas e roxas representam cnLOH.

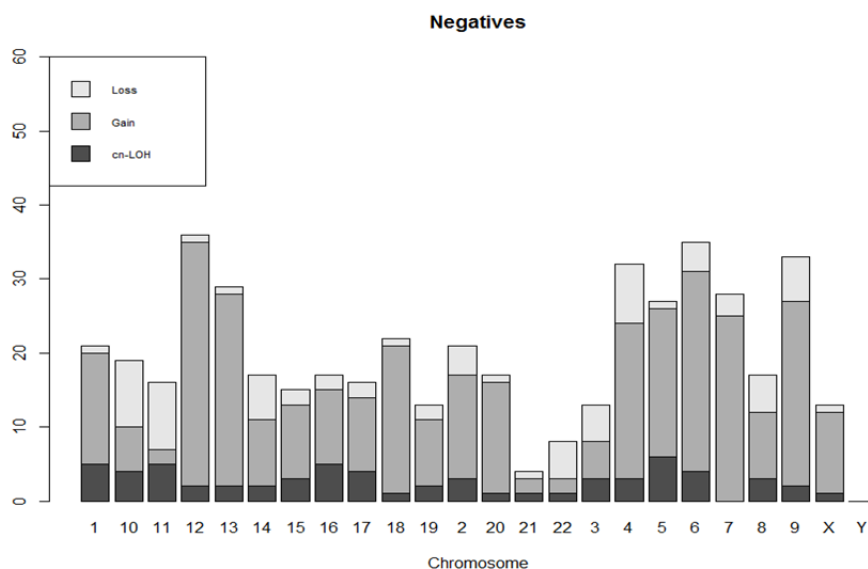


Figura 20 - Alterações genômicas distribuídas ao longo dos cromossomos, nos casos negativos, para mutações no gene *TP53*.

Foram identificadas alterações comuns para os quatro casos negativos para a mutação p.R337H (ADR-23, ADR-35, ADR-36 e ADR-37). Um total de 62 regiões estavam envolvidas em ganhos nos cromossomos 5, 7, 12, 15 e 20 e presentes nos quatro casos sem a mutação p.R337H. Esses casos também apresentaram 46 regiões com cnLOH (cromossomos 11 e 17) e todos eles apresentaram cnLOH no cromossomo 17. O caso ADR-23 apresentou alterações em todos os cromossomos, exceto no cromossomo X. Os casos ADR-35 e ADR-37 apresentaram alterações em todos os cromossomos e o caso ADR-36 não possui alterações somente nos cromossomos 22 e X.

Foram detectadas alterações exclusivas nos casos negativos para mutações no gene *TP53* (Tabela 8). Os cromossomos 16 e 21 apresentaram um maior número de genes envolvidos nestas alterações. Os genes mapeados na região alterada do cromossomo 16 foram previamente

relatados como marcadores de diferenciação celular (*TNFRSF12A*), fatores de transcrição (*SOX8*, *TFAP4*, *E4F1*, *ZSCAN10*, *ZNF205*, *ZNF213*, *ZNF200*, *MEFV*, *ZNF263*, *ZNF75A* e *ZNF174*), oncogene (*CREBBP*) e supressor tumoral (*TSC2*).

Dentre os genes mapeados na região alterada no cromossomo 21 foram identificados quatro oncogenes (*ERG*, *OLIG2*, *RUNX1* e *TMPRSS2*) além de fatores de transcrição (*NRIP1*, *GABPA*, *LTN1*, *BACH1*, *OLIG1*, *SETD4*, *SIM2*, *ETS2*, *PRDM15*, *PKNOX1*, *HSF2BP*, *AIRE* e *PTTG1IP*) e genes relacionados com diferenciação celular (*ITGB2*, *ICOSLG*, *IL10RB* e *JAM2*).

Tabela 8 - Regiões alteradas exclusivamente nos casos com ausência de mutações no gene *TP53*.

Chr	Início	Fim	Tamanho (pb)	Nº de Genes	ADR-23	ADR-35	ADR-36	ADR-37
2	2.43E+08	2.43E+08	0	0	Perda	Perda	Ganho	Ganho
2	2.43E+08	2.43E+08	0	0	Perda	Perda	Ganho	cnLOH/ Ganho
3	1.98E+08	1.98E+08	0	0	Ganho	cnLOH	cnLOH	cnLOH
10	23886647	29027976	5141329	30	cnLOH	Ganho	Ganho	Perda
10	135852	3368555	3232703	18	cnLOH	cnLOH	Ganho	cnLOH/ Perda
10	3395150	5762867	2367717	17	cnLOH	Ganho	Ganho	cnLOH/ Perda
10	22508360	23647550	1139190	12	cnLOH	Ganho	Ganho	cnLOH
10	20666976	22508360	1841384	9	cnLOH	Ganho	Ganho	cnLOH/ Perda
10	29183271	34044457	4861186	8	cnLOH	Ganho	Ganho	cnLOH
13	93950799	94630901	680102	2	Ganho	Ganho	Ganho	cnLOH
16	1134682	4317811	3183129	138	Perda	cnLOH	cnLOH	cnLOH
16	232072	1066396	834324	43	Perda	Ganho	cnLOH	cnLOH
16	4569069	5885940	1316871	20	Perda	Ganho	cnLOH	cnLOH
16	8610642	9263709	653067	8	cnLOH/ Ganho	Ganho	Ganho	cnLOH
16	8524466	8610642	86176	0	cnLOH	Ganho	Ganho	cnLOH
21	15006457	47699856	32693399	291	cnLOH	Ganho	Ganho	Perda

Legenda: Chr: Cromossomo.

4.2.6 Análise comparativa entre os pacientes positivos e negativos para a mutação p.R337H.

Alterações genômicas que diferenciam tumores positivos dos negativos para a mutação p.R337H foram identificadas usando o teste exato de Fisher sendo selecionadas as regiões com $p < 0,05$ (Ferramenta CoNVaQ, disponível em: <https://tomcat.compbio.sdu.dk>). Esta mesma ferramenta foi utilizada para a identificação dos processos biológicos alterados nos casos positivos, quando comparados com os negativos. Disponível em: <https://convaq.compbio.sdu.dk/#enrichment> (LARSEN et al. 2018).

Foram identificadas 21 alterações, envolvendo os cromossomos 1, 7 e 17. Ganhos no cromossomo 1 estavam presentes, em sua maioria, nos casos positivos para a mutação. Por outro lado, ganhos no cromossomo 7 foram observados somente nos casos negativos para a mutação no gene *TP53*. Todos os pacientes positivos apresentaram perda nas regiões descritas no cromossomo 17, ao passo que os casos negativos apresentaram cnLOH (Anexo 2).

Essas principais alterações englobaram um total de 1837 genes, envolvidos em 13 diferentes processos biológicos (Tabela 9), incluindo a via da MAPK. Esta via compreende uma subfamília de proteínas-quinase específicas de serina/treonina que respondem a estímulos extracelulares e regulam várias atividades celulares, como expressão gênica, mitose, diferenciação, sobrevivência celular e apoptose (DHILLON et al. 2007)

Tabela 9 - Processos biológicos identificados como alterados nos casos com a mutação p.R337H em relação aos negativos.

Funções moleculares e celulares*	p-value	Nº de Genes
Resposta ao interferon-gamma	4.58E-11	17
Morfogênese dos componentes celulares	1.46E-07	49
Locomoção	0.00000336	20
Via de sinalização mediada por citocinas	0.0000984	19
Organização de componentes celulares ou biogênese	0.000265	93
Processo Catabólico	0.000599	49
Organização do componente celular	0.00186	84
Cascata MAPK	0.00413	24
Regulação do processo metabólico do fosfato	0.0129	26
Via de sinalização do receptor acoplado à proteína G	0.0147	34
Regulação da atividade catalítica	0.0197	17
Resposta a estímulos externos	0.0228	22
Movimento de componentes celulares	0.0229	27

* Ferramenta utilizada: <https://convaq.compbio.sdu.dk/#enrichment> (LARSEN et al. 2018)

4.3 ANÁLISE DO GENOMA COMPLETO DOS PACIENTES LFS COM ADR

A principal análise realizada com os dados gerados pelo WGS consistiu da identificação de alterações de bases únicas (SNVs). As coberturas de mapeamento foram satisfatórias, atingindo a média de pelo menos 40 vezes para as amostras normais e pelo menos 100 vezes para as amostras tumorais (Figura 21).

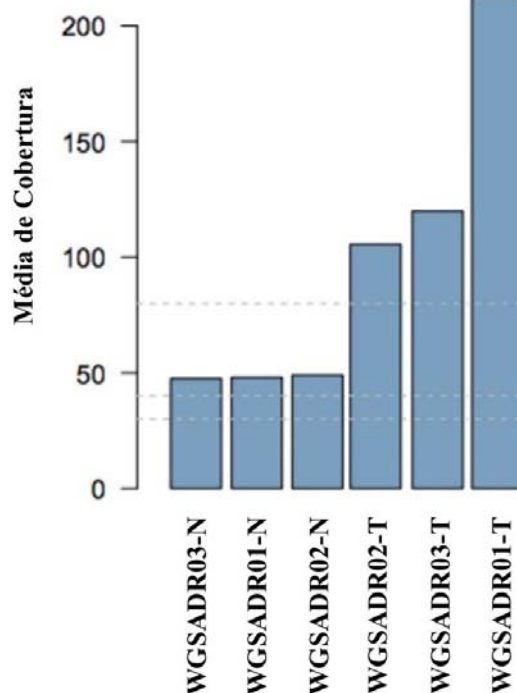


Figura 21 - Gráfico com as médias de cobertura do sequenciamento para as amostras de tecido normal e dos tumores adrenocorticais. N= Normal. T= Tumoral.

4.3.1 Overview das alterações de bases únicas e *indels*

Após a identificação das SNVs e das *indels* (pequenas inserções e deleções) foi possível notar que a paciente ADR-38 apresentou um número expressivamente maior de alterações (55.198 SNVs; 1.366 *indels*) comparado aos outros dois pacientes: ADR-31 (6.473 SNVs; 313 *indels*) e ADR-32 (3.605 SNVs; 141 *indels*). As Figuras 21, 22 e 23 representam o número de alterações encontradas nos três casos utilizando diferentes estratégias de análises. Três ferramentas de bioinformática, Mutect, Lofreq e Strelka, foram utilizadas para a identificação de SNVs e *indels* usando os resultados do sequenciamento de alto desempenho. O fluxograma

exemplificando o *pipeline* utilizado para esta análise está descrito na Figura 3.

A Figura 22 mostra todas as variantes (SNV e indels) encontradas no genoma do paciente ADR-31, 32 e 38, usando os dados de WGS (parte superior da figura) e também as variantes mapeadas em regiões exônicas (parte inferior da figura). É possível observar que a ferramenta mutect foi a que identificou o maior número de variantes nos três casos

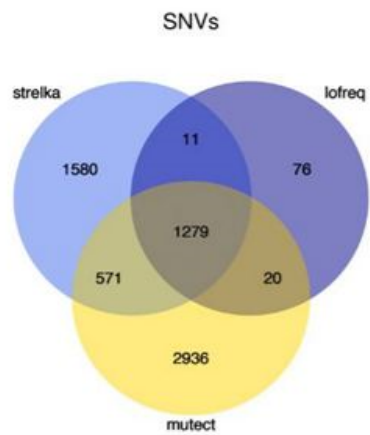
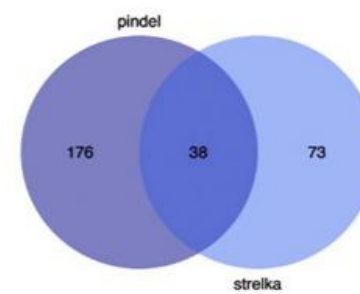
A

ADR-31

WGS

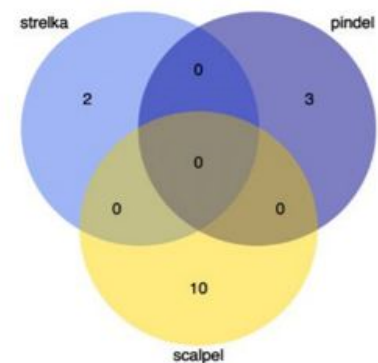
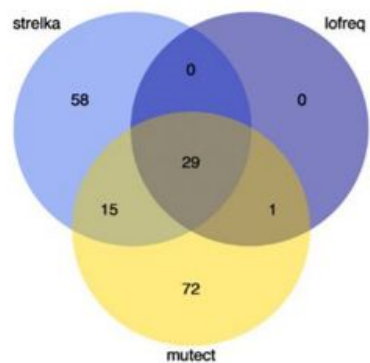
SNVs: 6473
 mutect: 4806
 lofreq: 1386
 strelka: 3441

Indels: 313
 pindel: 214
 strelka: 111

**Indels****Exonic**

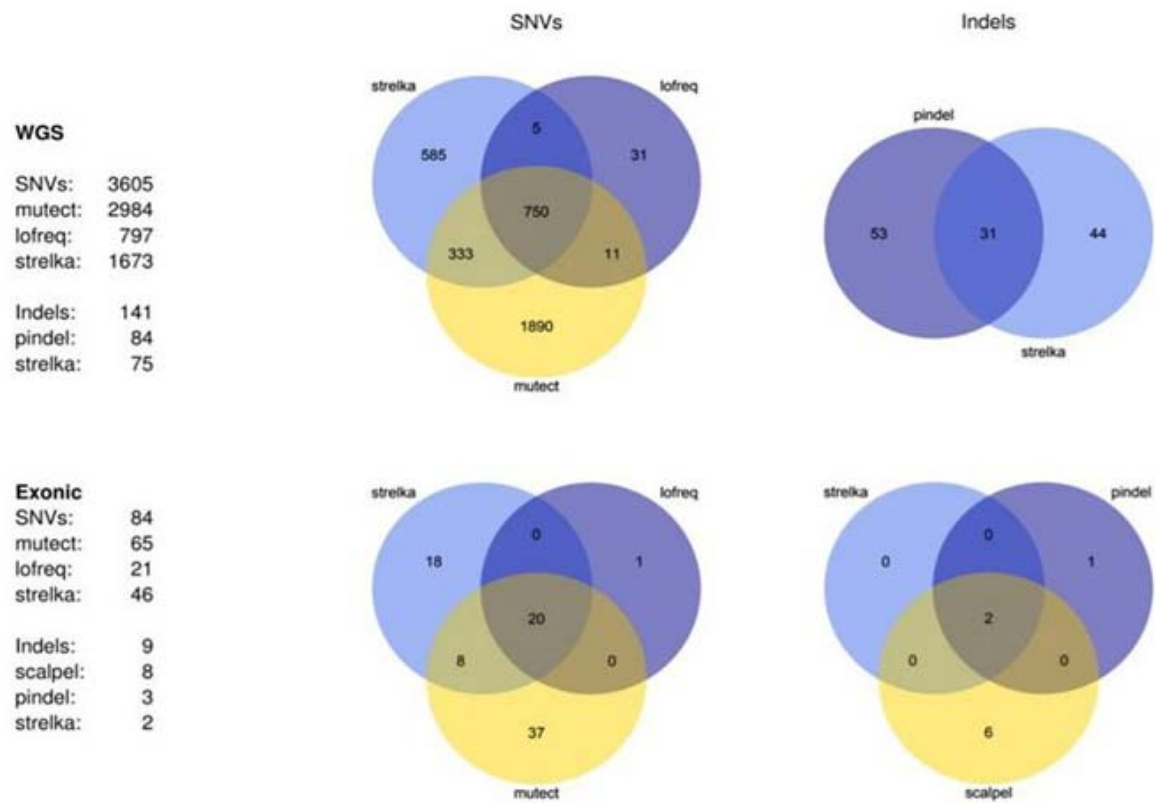
SNVs: 175
 mutect: 117
 lofreq: 30
 strelka: 102

Indels: 15
 scalpel: 10
 pindel: 3
 strelka: 2



B

ADR-32



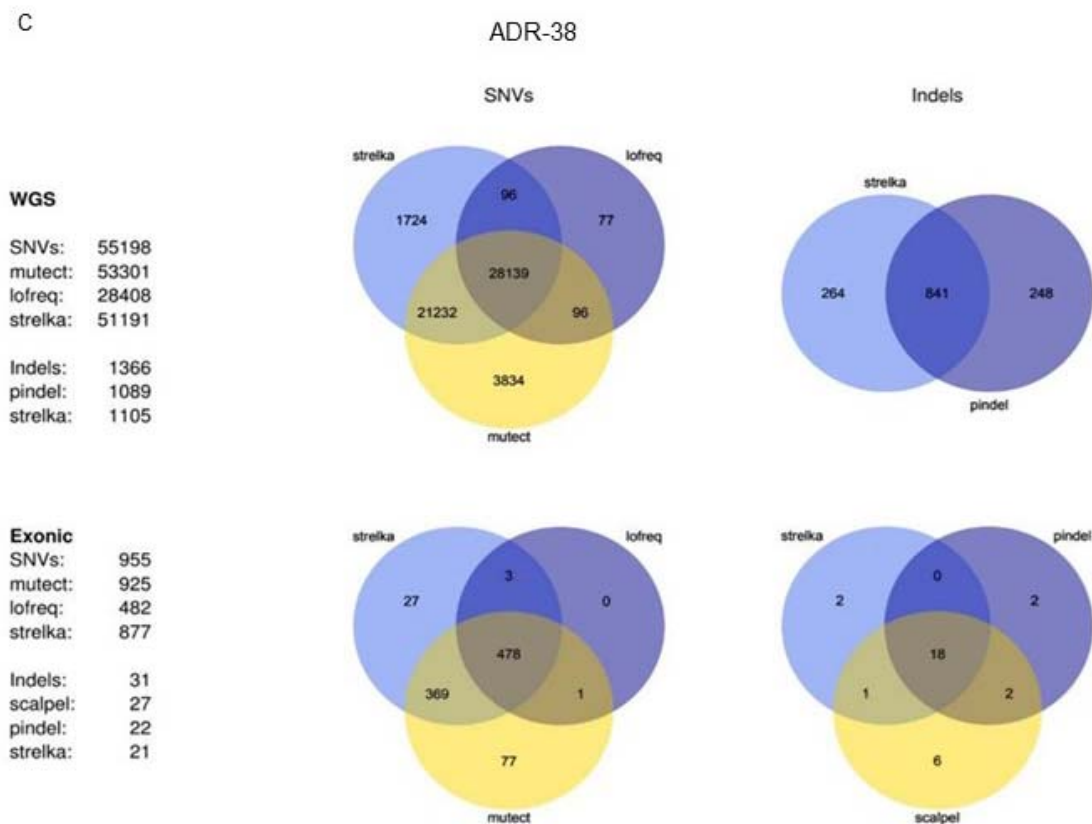


Figura 22 - Diagrama de Venn mostrando o número de alterações identificadas nos tres casos de ADR analisados neste estudo. **A.** ADR-31; **B.** ADR-32 e **C.** ADR-38. Para a identificação das variantes, foram utilizadas três ferramentas: Mutect, Lofreq e Strelka. O círculo amarelo mostra o número de alterações (SNV e indels) identificadas pela ferramenta Mutect. O círculo azul claro indica o número de alterações encontradas pela ferramenta Strelka, e o círculo roxo mostra o número de alterações identificado pela ferramenta lofreq. O número nas intersecções mostra as alterações identificadas por mais de uma ferramenta.

4.3.2 Análise das variantes dos carcinomas adrenocorticais com a mutação *TP53* p.R337H

Todas as variantes identificadas nos casos de carcinomas adrenocorticais, foram anotadas utilizando a ferramenta snpEff. A comparação do perfil de alterações dos três pacientes foi realizada com a utilização do IVA (*Ingenuity Variant Analysis*, Qiagen). Foram identificadas ao todo 3.071 alterações e destas, 1.119 eram alterações exônicas do tipo *missense*.

O caso ADR-31 apresentou 371 alterações distribuídas ao longo de todos os cromossomos, sendo que os cromossomos 1, 11, 16 e 19 apresentaram o maior número de alterações. Foram detectadas 361 alterações não sinônimas entre as 371 detectadas, 78 destas foram consideradas prejudiciais (*damaging*) ou possivelmente/provavelmente prejudiciais pelas duas ferramentas de predição utilizadas (Sift e PolyPhen-2).

Na tabela 10 é possível observar as 78 alterações exclusivamente encontradas na paciente com ADR pediátrico e que eram exônicas, *missense* e consideradas prejudiciais ou possivelmente/provavelmente prejudiciais segundo as ferramentas de predição SIFT e PolyPhen-2.

Tabela 10 - Lista de alterações presentes exclusivamente no caso de ADR pediátrico.

Chr	Começo	Fim	Ref	Alt	Gene	Variante		SIFT	Poly Phen-2
1	1403788	1403788	G	T	<i>ATAD3C</i>	p.Gly372Trp	c.1114G>T	Pr	Pr Pr
1	20442878	20442878	C	T	<i>PLA2G2D</i>	p.Gly45Ser	c.133G>A	Pr	Pr Pr
1	45553712	45553712	G	A	<i>ZSWIM5</i>	p.Arg265Cys	c.793C>T	Pr	Pr Pr
1	1,16E+08	1,16E+08	G	A	<i>NGF</i>	p.Arg180Trp	c.538C>T	Pr	Po Pr
1	1,57E+08	1,57E+08	T	C	<i>ARHGEF11</i>	p.Glu335Gly	c.1004A>G	Pr	Pr Pr
1	1,59E+08	1,59E+08	G	A	<i>OR6N1</i>	p.Leu86Phe	c.256C>T	Pr	Po Pr
1	2,28E+08	2,28E+08	G	A	<i>OBSCN</i>	p.Gly3841Arg	c.11521G>A	Pr	Pr Pr
1	2,28E+08	2,28E+08	C	T	<i>OBSCN</i>	p.Pro3995Leu	c.11984C>T	Pr	Pr Pr
1	2,3E+08	2,3E+08	T	C	<i>TAF5L</i>	p.Thr375Ala	c.1123A>G	Pr	Po Pr
1	2,46E+08	2,46E+08	C	T	<i>KIF26B</i>	p.Ser1294Leu	c.3881C>T	Pr	Po Pr
2	31564244	31564244	A	G	<i>XDH</i>	p.Arg314Cys	c.3536T>C	Pr	Pr Pr
2	71190322	71190322	C	T	<i>ATP6V1B1</i>		c.940C>T	Pr	Pr Pr
2	74641580	74641580	A	G	<i>C2orf81</i>	p.Met548Thr	c.1643T>C	Pr	Po Pr
2	74652775	74652775	T	C	<i>WDR54</i>	p.Phe318Leu	c.952T>C	Pr	Pr Pr
2	2,19E+08	2,19E+08	C	A	<i>TNS1</i>	p.Arg618Leu	c.1853G>T	Pr	Pr Pr
2	2,33E+08	2,33E+08	C	T	<i>ALPP</i>	p.Ala183Val	c.548C>T	Pr	Po Pr
3	98001858	98001858	A	G	<i>OR5H2</i>	p.Thr43Ala	c.127A>G	Pr	Pr Pr
4	69344609	69344609	T	G	<i>TMPRSS11E</i>	p.Ile337Arg	c.1010T>G	Pr	Pr Pr
5	1034393	1034393	A	C	<i>NKD2</i>	p.Glu125Ala	c.374A>C	Pr	Pr Pr
5	23524508	23524508	T	A	<i>PRDM9</i>		c.1016T>A	Pr	Pr Pr
5	81608561	81608561	C	T	<i>ATP6AP1L</i>	p.Ser88Phe	c.263C>T	Pr	Pr Pr
5	1,32E+08	1,32E+08	G	A	<i>SOWAHA</i>	p.Gly419Arg	c.1255G>A	Pr	Pr Pr
5	1,49E+08	1,49E+08	G	A	<i>SLC26A2</i>	p.Arg545His	c.1634G>A	Pr	Pr Pr
5	1,49E+08	1,49E+08	G	A	<i>TIGD6</i>	p.Arg10Trp	c.28C>T	Pr	Po Pr
5	1,54E+08	1,54E+08	G	C	<i>GEMIN5</i>	p.Pro594Arg	c.1781C>G	Pr	Pr Pr
5	1,57E+08	1,57E+08	T	A	<i>HAVCR2</i>	p.Asp170Val	c.509A>T	Pr	Po Pr
5	1,76E+08	1,76E+08	C	A	<i>GPRIN1</i>	p.Gly86Cys	c.256G>T	Pr	Pr Pr
5	1,79E+08	1,79E+08	G	C	<i>TBC1D9B</i>	p.Ser229Cys	c.686C>G	Pr	Pr Pr
6	26508753	26508753	C	G	<i>BTN1A1</i>	p.Thr311Arg	c.932C>G	Pr	Pr Pr
6	28268667	28268667	G	A	<i>PGBD1</i>	p.Asp346Asn	c.1036G>A	Pr	Po Pr
6	31737818	31737818	C	A	<i>VWA7</i>	p.Gly387Val	c.1160G>T	Pr	Pr Pr
6	54735115	54735115	A	G	<i>FAM83B</i>	p.Tyr24Cys	c.71A>G	Pr	Pr Pr
6	1,53E+08	1,53E+08	G	A	<i>SYNE1</i>	p.Arg1388Trp	c.4162C>T	Pr	Po Pr
7	1476466	1476466	G	A	<i>MICALL2</i>	p.Arg835Trp	c.2503C>T	Pr	Po Pr
8	6681102	6681102	C	T	<i>XKR5</i>			Pr	Po Pr
8	1,13E+08	1,13E+08	G	C	<i>CSMD3</i>	p.Pro2518Arg	c.7553C>G	Pr	Pr Pr
8	1,44E+08	1,44E+08	G	T	<i>RHPN1</i>	p.Arg528Leu	c.1583G>T	Pr	Pr Pr
9	1,16E+08	1,16E+08	A	G	<i>ZFP37</i>	p.Cys313Arg	c.937T>C	Pr	Pr Pr
9	1,24E+08	1,24E+08	T	C	<i>C5</i>	p.Ser978Gly	c.2932A>G	Pr	Po Pr
9	1,4E+08	1,4E+08	G	A	<i>NDOR1</i>	p.Val568Ile	c.1702G>A	Pr	Po Pr
10	18828498	18828498	C	T	<i>CACNB2</i>	p.Arg610Trp	c.1828C>T	Pr	Po Pr

Cont/ Tabela 10

Chr	Começo	Fim	Re f	Alt	Gene	Variante		SIFT	Poly Phen-2
11	725751	725751	G	C	<i>EPS8L2</i>	p.Trp544Cys	c.1632G>C	Pr	Pr Pr
11	4621997	4621997	T	C	<i>TRIM68</i>	p.Lys323Glu	c.967A>G	Pr	Pr Pr
11	16824599	16824599	C	T	<i>PLEKHA7</i>	p.Val693Ile	c.2077G>A	Pr	Po Pr
11	44640672	44640672	A	G	<i>CD82</i>	p.Tyr267Cys	c.800A>G	Pr	Pr Pr
11	67191103	67191103	C	A	<i>CARNS1</i>	p.Ser628Arg	c.1884C>A	Pr	Pr Pr
11	1,19E+08	1,19E+08	G	A	<i>HYOU1</i>	p.Arg262Trp	c.784C>T	Pr	Po Pr
12	665907	665907	G	T	<i>B4GALNT3</i>	p.Gly752Val	c.2255G>T	Pr	Po Pr
12	2968078	2968078	G	A	<i>FOXM1</i>	p.Pro711Leu	c.2132C>T	Pr	Po Pr
12	31820718	31820718	C	G	<i>ETFBKMT</i>	p.Leu195Val	c.583C>G	Pr	Po Pr
13	22077136	22077136	G	A	<i>MICU2</i>	p.Leu288Phe	c.862C>T	Pr	Pr Pr
13	31233377	31233377	A	T	<i>USPL1</i>	p.Ser1055Cys	c.3163A>T	Pr	Pr Pr
14	23876339	23876339	C	G	<i>MYH6</i>	p.Asp32His	c.94G>C	Pr	Po Pr
14	24526449	24526449	A	G	<i>CARMIL3</i>	p.Asp379Gly	c.1136A>G	Pr	Pr Pr
14	30133000	30133000	G	A	<i>PRKD1</i>	p.Arg201Trp	c.601C>T	Pr	Po Pr
14	81329199	81329199	G	A	<i>CEP128</i>	p.Arg222Trp	c.664C>T	Pr	Pr Pr
14	94419749	94419749	C	T	<i>ASB2</i>	p.Gly195Arg	c.583G>A	Pr	Pr Pr
15	72454690	72454690	A	G	<i>GRAMD2A</i>	p.Tyr329His	c.985T>C	Pr	Pr Pr
16	1997064	1997064	G	A	<i>RPL3L</i>	p.Arg242Trp	c.724C>T	Pr	Pr Pr
16	3077066	3077066	G	A	<i>THOC6</i>	p.Asp231Asn	c.691G>A	Pr	Pr Pr
16	10788624	10788624	T	C	<i>TEKT5</i>	p.Tyr36Cys	c.107A>G	Pr	Pr Pr
16	20787240	20787240	T	C	<i>ACSM3</i>	p.Leu100Pro	c.299T>C	Pr	Pr Pr
16	23707215	23707215	C	T	<i>ERN2</i>	p.Arg585Gln	c.1754G>A	Pr	Pr Pr
16	70304215	70304215	G	A	<i>AARS</i>	p.Pro234Ser	c.700C>T	Pr	Pr Pr
17	3643130	3643130	C	T	<i>ITGAE</i>	p.Ala831Thr	c.2491G>A	Pr	Pr Pr
17	56276536	56276536	G	A	<i>EPX</i>	p.Arg419Gln	c.1256G>A	Pr	Pr Pr
17	67247900	67247900	G	C	<i>ABCA5</i>	p.Ser1509Cys	c.4526C>G	Pr	Po Pr
17	74005379	74005379	G	A	<i>EVPL</i>	p.Arg1325Cys	c.3973C>T	Pr	Po Pr
19	8601425	8601425	G	T	<i>MYO1F</i>	p.Ala619Asp	c.1856C>A	Pr	Pr Pr
19	52869712	52869712	C	T	<i>ZNF610</i>	p.Arg361Trp	c.1081C>T	Pr	Po Pr
20	35517702	35517702	C	A	<i>TLDC2</i>	p.Ser187Arg	c.561C>A	Pr	Pr Pr
20	35661243	35661243	G	C	<i>RBL1</i>	p.Pro736Arg	c.2207C>G	Pr	Po Pr
20	43142614	43142614	G	A	<i>SERINC3</i>	p.Thr36Met	c.107C>T	Pr	Po Pr
20	60913320	60913320	G	A	<i>LAMA5</i>	p.Ala575Val	c.1724C>T	Pr	Pr Pr
20	62729814	62729814	C	T	<i>OPRL1</i>	p.Arg259Trp	c.775C>T	Pr	Pr Pr
21	30380588	30380588	G	A	<i>RWDD2B</i>	p.Pro112Leu	c.335C>T	Pr	Pr Pr
22	31867903	31867903	C	T	<i>EIF4ENIF1</i>	p.Glu33Lys	c.97G>A	Pr	Pr Pr
X	1,02E+08	1,02E+08	G	C	<i>NXF3</i>	p.Leu424Val	c.1270C>G	Pr	Pr Pr
X	1,03E+08	1,03E+08	T	C	<i>GLRA4</i>	p.Asp199Gly	c.596A>G	Pr	Pr Pr
X	1,35E+08	1,35E+08	T	A	<i>ADGRG4</i>	p.Val882Asp	c.2645T>A	Pr	Pr Pr

Legenda: Chr: Cromossomo, Ref: Referência, Alt: Alteração, P: Patogênica, PrP: Provavelmente Patogênica e PoP: Possivelmente Patogênica.

O caso ADR-32 apresentou 374 alterações distribuídas ao longo de todos os cromossomos, com exceção do cromossomo Y, sendo que os cromossomos 1, 17 e 19 apresentaram o maior número de alterações. Destas 374 alterações, 372 são não sinônimas e destas, 79 são consideradas patogênicas por pelo menos uma das ferramentas de predição (SIFT e PolyPhen-2) (Tabela 11).

Tabela 11 - Lista de alterações presentes no caso ADR-32.

Chr	Começo	Fim	Ref	Alt	Gene	Variante	SIFT	PolyPhen-2
1	6272028	6272028	G	A	<i>RNF207</i>	p.R404Q	P	Po P
1	2,25E+08	2,25E+08	C	G	<i>DNAH14</i>	p.T1552R	P	Po P
1	2,48E+08	2,48E+08	C	A	<i>OR2G3</i>	p.D175E	P	Pr P
1	39893177	39893177	C	T	<i>MACF1</i>	p.T3394I	P	Pr P
1	1,16E+08	1,16E+08	A	G	<i>SYCP1</i>	p.D889G	P	Pr P
1	6655595	6655595	C	T	<i>KLHL21</i>	p.V484M	P	Pr P
1	1,1E+08	1,1E+08	C	T	<i>GNAI3</i>	p.T170I	P	Pr P
1	1,1E+08	1,1E+08	G	A	<i>CELSR2</i>	p.G1992R	P	Pr P
1	1,14E+08	1,14E+08	C	T	<i>LRIG2</i>	p.R145W	P	Pr P
2	2,34E+08	2,34E+08	C	T	<i>USP40</i>	p.G686D	P	Po P
2	2,35E+08	2,35E+08	C	T	<i>SPP2</i>	p.S38F	P	Po P
2	74689609	74689609	G	A	<i>MOGS</i>	p.T436I	P	Po P
2	2,02E+08	2,02E+08	G	A	<i>CASP10</i>	p.A398T	P	Pr P
2	44513202	44513202	T	C	<i>SLC3A1</i>	p.F266S	P	Po P
2	2,28E+08	2,28E+08	G	C	<i>IRS1</i>	p.S273W	P	Pr P
2	1,2E+08	1,2E+08	G	A	<i>DBI</i>	p.G87R	P	Po P
3	1,9E+08	1,9E+08	C	A	<i>TP63</i>	p.P511T	P	Po P
3	48608103	48608103	G	C	<i>COL7A1</i>	p.P2438R	P	Po P
3	36872519	36872519	C	A	<i>TRANK1</i>	p.G2808V	P	Pr P
3	93646101	93646101	G	A	<i>PROS1</i>	p.P108L	P	Pr P
3	48600230	48600230	C	T	<i>UCN2; PFKFB4</i>	p.G110S	P	Po P
3	57312746	57312746	C	T	<i>ASB14</i>	p.V364I	P	Pr P
3	15116371	15116371	C	T	<i>RBSN</i>	p.G425R	P	Po P
4	1,55E+08	1,55E+08	A	C	<i>DCHS2</i>	p.S2117A	P	Pr P
4	1,29E+08	1,29E+08	C	T	<i>PLK4</i>	p.P285L	P	Po P
4	1,66E+08	1,66E+08	C	T	<i>TRIM61</i>	p.A136T	P	Pr P
4	1,52E+08	1,52E+08	A	C	<i>LRBA</i>	p.F1531V	P	Pr P
5	42797018	42797018	A	T	<i>CCDC152</i>	p.E173V	P	Po P
5	96121496	96121496	C	T	<i>ERAP1</i>	p.V647I	P	Pr P
5	1,42E+08	1,42E+08	C	T	<i>ARHGAP26</i>	p.A20V	P	Pr P
6	29454951	29454951	A	T	<i>MAS1L</i>	p.S243R	P	Pr P
6	70866095	70866095	C	T	<i>COL19A1</i>	p.P719L	P	Pr P
6	24559301	24559301	G	A	<i>KIAA0319</i>	p.R303W	P	Po P
6	1,33E+08	1,33E+08	A	G	<i>TAAR5</i>	p.S95P	P	Pr P
7	5965308	5965308	T	G	<i>CCZ1/CCZ1B</i>	p.F480C	P	Pr P
8	39624388	39624388	A	G	<i>ADAM2</i>	p.C477R	P	Pr P
8	196121	196121	G	T	<i>ZNF596</i>	p.G425V	P	Pr P
8	1,45E+08	1,45E+08	C	A	<i>EPPK1</i>	p.G102V	P	Pr P
10	98346537	98346537	A	G	<i>TM9SF3</i>	p.L19P	P	Po P
10	99371384	99371384	C	T	<i>HOGA1</i>	p.R318C	P	Pr P

Cont/ Tabela 11

Chr	Começo	Fim	Ref	Alt	Gene	Variante	SIFT	PolyPhen
11	58189912	58189912	A	G	<i>OR5B2</i>	p.F275L	P	Po P
11	66637856	66637856	C	T	<i>PC</i>	p.V274M	P	Pr P
11	57182534	57182534	C	A	<i>SLC43A3</i>	p.S272I	P	Po P
11	82985756	82985756	G	A	<i>CCDC90B</i>	p.H3Y	P	Pr P
11	64120895	64120895	C	T	<i>CCDC88B</i>	p.R1254W	P	Pr P
12	1,23E+08	1,23E+08	C	A	<i>HCAR1</i>	p.V136F	P	Po P
12	1,06E+08	1,06E+08	T	C	<i>WASHC4</i>	p.S226P	P	Pr P
12	992598	992598	C	T	<i>WNK1</i>	p.S1428L	P	Po P
13	53039442	53039442	G	A	<i>CKAP2</i>	p.E441K	P	Po P
14	70245238	70245238	C	T	<i>SLC10A1</i>	p.R252H	P	Pr P
14	59108364	59108364	C	T	<i>DACT1</i>	p.S178L	P	Pr P
15	83331533	83331533	T	C	<i>AP3B2</i>	p.N916D	P	Pr P
15	44778838	44778838	A	G	<i>CTDSPL2</i>	p.T139A	P	Pr P
15	58834027	58834027	C	T	<i>LIPC</i>	p.A106V	P	Pr P
15	45440600	45440600	C	T	<i>DUOX1</i>	p.R925W	P	Pr P
16	78149000	78149000	C	T	<i>WWOX</i>	p.R7W	P	Po P
16	1838641	1838641	G	T	<i>NUBP2</i>	p.W99L	P	Po P
16	66423374	66423374	G	A	<i>CDH5</i>	p.V244M	P	Pr P
17	72249908	72249908	T	C	<i>TTYH2</i>	p.L466P	P	Pr P
17	29171026	29171026	A	T	<i>ATAD5</i>	p.K779N	P	Pr P
17	9546432	9546432	C	T	<i>CFAP52</i>	p.R594C	P	Po P
17	42427661	42427661	T	C	<i>GRN</i>	p.C139R	P	Pr P
17	19470482	19470482	A	G	<i>SLC47A1</i>	p.Y417C	P	Pr P
17	46136969	46136969	G	A	<i>NFE2L1</i>	p.R751Q	P	Pr P
17	1183612	1183612	T	C	<i>TUSC5</i>	p.I106T	P	Po P
17	56598994	56598994	A	G	<i>43347</i>	p.I291T	P	Pr P
17	8701222	8701222	G	A	<i>MFSD6L</i>	p.S406L	P	Pr P
17	40257124	40257124	G	T	<i>DHX58</i>	p.T438K	P	Pr P
17	73738809	73738809	C	T	<i>ITGB4</i>	p.R977C	P	Pr P
19	53668034	53668034	T	C	<i>ZNF665</i>	p.Y568C	P	Pr P
19	8168499	8168499	G	A	<i>FBN3</i>	p.T1629I	P	Pr P
19	36642364	36642364	C	A	<i>COX7A1</i>	p.G63C	P	Pr P
20	9424868	9424868	C	A	<i>PLCB4</i>	p.S941Y	P	Po P
20	62607179	62607179	G	A	<i>SAMD10</i>	p.A151V	P	Pr P
20	34519258	34519258	A	G	<i>PHF20</i>	p.Y731C	P	Pr P
20	46268708	46268708	A	G	<i>NCOA3</i>	p.Y993C	P	Pr P
20	60551270	60551270	C	T	<i>TAF4</i>	p.R1071H	P	Pr P
20	49226132	49226132	C	T	<i>RIPOR3</i>	p.R185H	P	Pr P
22	17581294	17581294	A	C	<i>IL17RA</i>	p.E158A	P	Pr P

Legenda: Chr: cromossomo, Ref: referência, Alt: alteração, Pr: prejudicial, PrPr: Provavelmente prejudicial e PoPr possivelmente prejudicial.

O caso ADR-38 apresentou 346 alterações distribuídas ao longo de todos os cromossomos, com exceção do cromossomo 21, sendo que os cromossomos 1, 11 e 19 mostraram o maior número de alterações. Um total de 344 alterações não sinônimas foi detectada entre as 346 alterações e destas, 96 foram categorizadas como prejudiciais pela ferramenta de predição SIFT e possivelmente/provavelmente prejudiciais pela ferramenta PolyPhen-2 (Tabela 12).

Tabela 12 - Lista de alterações presentes no caso ADR-38.

Chr	Começo	Fim	Ref	Alt	Gene	Variante	SIFT	PolyPhen-2
1	12942963	12942963	C	T	<i>PRAMEF4</i>	p.D85N	Pr	Po Pr
1	94473287	94473287	G	A	<i>ABCA4</i>	p.L1970F	Pr	Pr Pr
1	62676991	62676991	T	G	<i>L1TD1</i>	p.Y849D	Pr	Po Pr
1	151105831	151105831	T	C	<i>SEMA6C</i>	p.E641G	Pr	Pr Pr
1	27875698	27875698	C	T	<i>AHDC1</i>	p.G977R	Pr	Pr Pr
1	100382037	100382037	A	G	<i>AGL</i>	p.N1428S	Pr	Pr Pr
1	17263229	17263229	C	T	<i>CROCC</i>	p.R352W	Pr	Po Pr
1	225700618	225700618	C	A	<i>ENAH</i>	p.G440V	Pr	Pr Pr
1	17272778	17272778	G	A	<i>CROCC</i>	p.E721K	Pr	Po Pr
1	9322153	9322153	C	T	<i>H6PD</i>	p.R272C	Pr	Pr Pr
2	44059195	44059195	G	C	<i>ABCG5</i>	p.A98G	Pr	Po Pr
2	233404771	233404771	G	A	<i>CHRNA</i>	p.R42Q	Pr	Pr Pr
2	24483979	24483979	C	G	<i>ITSN2</i>	p.G880A	Pr	Pr Pr
2	120005583	120005583	G	C	<i>STEAP3</i>	p.G284A	Pr	Pr Pr
2	25038522	25038522	T	G	<i>CENPO</i>	p.I158R	Pr	Po Pr
2	43802152	43802152	G	A	<i>THADA</i>	p.T311M	Pr	Po Pr
2	95815569	95815569	G	A	<i>ZNF514</i>	p.R294C	Pr	Po Pr
2	220089381	220089381	C	T	<i>ATG9A</i>	p.G238R	Pr	Po Pr
3	56766353	56766353	C	T	<i>ARHGEF3</i>	p.V381M	Pr	Pr Pr
3	128991181	128991181	C	T	<i>COPG1</i>	p.P694L	Pr	Pr Pr
3	120469550	120469550	C	G	<i>GTF2E1</i>	p.L51V	Pr	Pr Pr
3	50005855	50005855	G	A	<i>RBM6</i>	p.E333K	Pr	Pr Pr
3	185998497	185998497	C	A	<i>DGKG</i>	p.A211S	Pr	Pr Pr
3	14763251	14763251	C	T	<i>C3orf20</i>	p.S509L	Pr	Pr Pr
3	32529434	32529434	G	C	<i>CMTM6</i>	p.A137G	Pr	Pr Pr
3	148577674	148577674	G	A	<i>CPB1</i>	p.R380Q	Pr	Pr Pr

Cont/ Tabela 12

Chr	Começo	Fim	Ref	Alt	Gene	Variante	SIFT	PolyPhen-2
3	175473134	175473134	G	A	<i>NAALADL2</i>	p.R706Q	Pr	Pr Pr
4	90874562	90874562	G	T	<i>MMRN1</i>	p.R1227L	Pr	Pr Pr
4	39236461	39236461	A	G	<i>WDR19</i>	p.I777V	Pr	Po Pr
4	5733317	5733317	G	A	<i>EVC</i>	p.D184N	Pr	Po Pr
4	25335007	25335007	C	T	<i>ZCCHC4</i>	p.R178W	Pr	Pr Pr
4	103556064	103556064	G	A	<i>MANBA</i>	p.R766W	Pr	Pr Pr
4	187542899	187542899	G	A	<i>FAT1</i>	p.P1614L	Pr	Pr Pr
4	96762158	96762158	G	C	<i>PDHA2</i>	p.R286P	Pr	Pr Pr
5	32126523	32126523	C	A	<i>GOLPH3</i>	p.R231L	Pr	Pr Pr
5	140554245	140554245	C	T	<i>PCDHB7</i>	p.T610M	Pr	Pr Pr
5	80641743	80641743	A	G	<i>ACOT12</i>	p.L245P	Pr	Pr Pr
5	56558491	56558491	C	T	<i>GPBP1</i>	p.P274L	Pr	Pr Pr
5	178050332	178050332	C	T	<i>CLK4</i>	p.R29Q	Pr	Pr Pr
6	31595657	31595657	G	A	<i>PRRC2A</i>	p.R469Q	Pr	Pr Pr
6	39082831	39082831	C	T	<i>SAYSD1</i>	p.R12Q	Pr	Pr Pr
6	96985388	96985388	A	T	<i>UFL1</i>	p.E314V	Pr	Po Pr
7	36466579	36466579	T	A	<i>ANLN</i>	p.V904D	Pr	Pr Pr
7	123256498	123256498	C	G	<i>ASB15</i>	p.H81D	Pr	Pr Pr
8	119936978	119936978	C	T	<i>TNFRSF11B</i>	p.V281M	Pr	Pr Pr
8	144994064	144994064	G	A	<i>PLEC</i>	p.R3309C	Pr	Pr Pr
8	100146901	100146901	G	T	<i>VPS13B</i>	p.Q416H	Pr	Pr Pr
8	75227597	75227597	C	G	<i>JPH1</i>	p.R213P	Pr	Pr Pr
9	74561983	74561983	G	A	<i>C9orf85</i>	p.R55H	Pr	Po Pr
9	107456995	107456995	T	A	<i>OR13D1</i>	p.L98H	Pr	Pr Pr
9	123904538	123904538	T	C	<i>CNTRL</i>	p.L402S	Pr	Po Pr
10	112581039	112581039	G	A	<i>RBM20</i>	p.D888N	Pr	Po Pr
10	81918889	81918889	A	T	<i>ANXA11</i>	p.S415T	Pr	Po Pr
10	18789874	18789874	C	T	<i>CACNB2</i>	p.S149F	Pr	Po Pr
11	18309464	18309464	G	A	<i>HPS5</i>	p.P732L	Pr	Pr Pr
11	1028379	1028379	C	T	<i>MUC6</i>	p.G534S	Pr	Pr Pr
11	6530401	6530401	G	C	<i>DNHD1</i>	p.K378N	Pr	Po Pr
11	118532170	118532170	G	C	<i>TREH</i>	p.S222R	Pr	Pr Pr
11	134238603	134238603	G	A	<i>GLB1L2</i>	p.G319R	Pr	Pr Pr
11	64955459	64955459	C	T	<i>CAPN1</i>	p.R293W	Pr	Pr Pr
12	109539760	109539760	C	G	<i>UNG</i>	p.H154Q	Pr	Pr Pr

Cont/ Tabela 12

Chr	Começo	Fim	Ref	Alt	Gene	Variante	SIFT	PolyPhen-2
12	57167812	57167812	C	T	<i>HSD17B6</i>	p.A59V	Pr	Po Pr
13	29287326	29287326	C	A	<i>SLC46A3</i>	p.G184V	Pr	Pr Pr
13	96506633	96506633	C	T	<i>UGGT2</i>	p.G1369R	Pr	Pr Pr
14	33069942	33069942	G	A	<i>AKAP6</i>	p.E892K	Pr	Pr Pr
14	69520885	69520885	G	A	<i>DCAF5</i>	p.R840C	Pr	Po Pr
14	102800909	102800909	C	T	<i>ZNF839</i>	p.R479W	Pr	Po Pr
15	89873364	89873364	C	G	<i>POLG</i>	p.G268A	Pr	Pr Pr
15	75042806	75042806	C	T	<i>CYP1A2</i>	p.R243C	Pr	Pr Pr
15	90214751	90214751	C	T	<i>PLIN1</i>	p.E99K	Pr	Pr Pr
16	135414	135414	G	A	<i>MPG</i>	p.V174I	Pr	Po Pr
16	19547863	19547863	A	G	<i>CCP110</i>	p.D291G	Pr	Pr Pr
16	77353859	77353859	C	T	<i>ADAMTS18</i>	p.D807N	Pr	Pr Pr
16	23702280	23702280	G	A	<i>ERN2</i>	p.R885C	Pr	Pr Pr
17	59924572	59924572	G	A	<i>BRIP1</i>	p.R173C	Pr	Pr Pr
17	40767021	40767021	C	T	<i>TUBG1</i>	p.R440W	Pr	Po Pr
17	39394626	39394626	C	G	<i>KRTAP9-8</i>	p.P108R	Pr	Pr Pr
17	80016283	80016283	A	T	<i>DUS1L</i>	p.C406S	Pr	Pr Pr
17	4905807	4905807	C	T	<i>KIF1C</i>	p.P160S	Pr	Po Pr
17	39506824	39506824	G	A	<i>KRT33A</i>	p.R66C	Pr	Pr Pr
19	48602951	48602951	C	A	<i>PLA2G4C</i>	p.V142F	Pr	Po Pr
19	54313928	54313928	G	A	<i>NLRP12</i>	p.R329W	Pr	Pr Pr
19	15302941	15302941	T	C	<i>NOTCH3</i>	p.H170R	Pr	Po Pr
19	49967454	49967454	C	T	<i>ALDH16A1</i>	p.T371M	Pr	Pr Pr
19	44891133	44891133	T	A	<i>ZNF285</i>	p.E425V	Pr	Pr Pr
19	49472837	49472837	G	A	<i>GYS1</i>	p.S641L	Pr	Pr Pr
20	61443809	61443809	G	A	<i>OGFR</i>	p.R281H	Pr	Pr Pr
20	62174803	62174803	C	T	<i>SRMS</i>	p.R170Q	Pr	Pr Pr
20	44640353	44640353	C	T	<i>MMP9</i>	p.R322W	Pr	Po Pr
21	38390446	38390446	G	A	<i>RIPPLY3</i>	p.G87E	Pr	Po Pr
X	105193709	105193709	A	G	<i>NRK</i>	p.D1499G	Pr	Po Pr
X	77528954	77528954	C	T	<i>CYSLTR1</i>	p.R97H	Pr	Pr Pr
X	69498482	69498482	C	G	<i>ARR3</i>	p.S299C	Pr	Pr Pr
X	24745161	24745161	C	T	<i>POLA1</i>	p.P496S	Pr	Po Pr
X	99931103	99931103	C	T	<i>SYTL4</i>	p.M646I	Pr	Pr Pr
X	54578035	54578035	C	T	<i>GNL3L</i>	p.R300W	Pr	Pr Pr

Legenda: Chr: cromossomo, Ref: referência, Alt: alteração, Pr: prejudicial, PrPr: Provavelmente prejudicial e PoPr possivelmente prejudicial.

Ainda considerando as variantes em região exônicas e que são *missense*, a única alteração compartilhada pelos três pacientes é a *TP53* p.R337H.

Os dois casos de ADR diagnosticados na fase adulta, compartilharam quatro mutações exônicas e *missense*. As alterações estão localizadas nos cromossomos 1 (*PRAMEF4*; p.D85N; c.G253A), 15 (*FMN1*; p.R560C; c.1678C>T e p.R319Q; c.956G>A) e 17 (*DNAH9*; p.P599L; c.C1796T).

Apenas a alteração no gene *PRAMEF4* (c.253G>A) foi considerada possivelmente prejudicial pelas ferramentas de predição SIFT e PolyPhen-2.

Considerando a anotação realizada pelo *Intervar*, que é uma ferramenta automática que classifica as variantes com base nas diretrizes descritas pelo ACMG (do inglês: *American College of Medical Genetics and Genomics*), apenas seis genes (*HBB*, *MSR1*, *SH3TC2*, *LSS*, *ABCA4* e *TP53*) apresentaram alterações consideradas patogênicas ou possivelmente patogênicas. As alterações *non-sense* identificadas nos genes *HBB*, *MSR1* e *SH3TC2* foram consideradas patogênicas pelo InterVar, no entanto não foram anotadas para o SIFT e o Poly-Phen2.

Já das três alterações *missenses* identificadas, a detectada no gene *LSS* (p.G196A; c.620G>C), foi considerada tolerada pelo SIFT, provavelmente prejudicial pelo Poly-Phen e possivelmente patogênica pelo InterVar. A alteração no gene *ABCA4* (p.L1970F; c.5908C>T) foi considerada prejudicial pelo SIFT, provavelmente prejudicial pelo PolyPhen-2 e possivelmente patogênica pelo InterVar.

Interessantemente, a única alteração patogênica encontrada nos três casos é a *TP53* p.R337H (Tabela 13).

Tabela 13 - Lista de alterações consideradas patogênicas pela anotação InterVar.

ID	Chr	Começo	Fim	Ref	Alt	Gene	Variante	Classificação	SIFT	Poly Phen-2	InterVar
ADR-31	11	5248004	5248004	G	A	<i>HBB</i>	p.Q40*	<i>Non sense</i>	-	-	P
ADR-32	8	16012594	16012594	G	A	<i>MSR1</i>	p.R293*	<i>Non sense</i>	-	-	P
ADR-32	5	148406435	148406435	G	A	<i>SH3TC2</i>	p.R954*	<i>Non sense</i>	-	-	P
ADR-38	21	47639417	47639417	C	G	<i>LSS</i>	p.G196A	<i>Missense</i>	To	Pr Pr	PoP
ADR-38	1	94473287	94473287	G	A	<i>ABCA4</i>	p.L1970F	<i>Missense</i>	Pr	Pr Pr	PoP
ADR 31/32/38	17	7574017	7574017	C	T	<i>TP53</i>	p.R337H	<i>Missense</i>	To	Pr Pr	P

Legenda: Chr: cromossomo. P: Variante Patogênica; PoP: Variante possivelmente patogênica. PrPr: Provavelmente Prejudicial. To: Tolerada. A classificação das variantes foi realizada de acordo com a *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG). A classificação é baseada em um conjunto de 28 critérios (16 critérios de patogenia e 12 critérios de benignidade), representando tanto evidências objetivas (experimentais) quanto subjetivas.

5 DISCUSSÃO

O ADR é uma neoplasia rara, cuja incidência anual estimada é de cerca 0,5-2 casos por milhão/ano (WOOTEN et al. 1993; KEBEBEW et al. 2006), dados estes que corroboram com os nossos achados, onde a taxa de incidência padronizada por idade foi de 0,6 e 1,0 por 1.000.000 (1973 e 2014) para as mulheres e 0,6 e 1,0 por 1.000.000 (1973 e 2014) para os homens.

Em 2006, utilizando o mesmo banco de dados do SEER, KEBEBEW et al. descreveram que a incidência anual de ADR nos EUA no período de 1973 a 2000 era 0,72 casos por milhão. Recentemente, SHARMA et al. (2018) utilizando exatamente a mesma população avaliada no nosso estudo e sem a distinção por gênero, reportou uma incidência de 1,02 casos por milhão. Apesar desse pequeno valor, é possível notar o aumento da incidência de ADR na população dos EUA com o passar dos anos. Fato este, que pode estar diretamente relacionado com a melhora no diagnóstico e com o aumento da utilização de exames de imagens mais sensíveis (MANSMANN et al. 2004).

Entretanto, dados provenientes do registro alemão de ADR sugerem que a incidência de ADR é superior a um por milhão, podendo ser ainda maior (FASSNACHT e ALLOLIO 2011). Em contrapartida, diferente do nosso estudo e dos citados anteriormente, quando foi realizado uma análise

na população holandesa, houve uma tendência para diminuição da incidência anual (KERKHOF et al. 2013).

O ADR é um tumor agressivo que acomete indivíduos de ambos os sexos, embora tenha sido relatada em literatura uma proporção maior de indivíduos do sexo feminino (LATRONICO e CHROUSOS 1997). Nossos achados também revelaram uma maior proporção de indivíduos do sexo feminino (1,3:1) com o câncer adrenocortical.

Além disso, outra característica que vem sendo descrita é a distribuição bimodal, onde diversos autores relatam um pico de incidência até os 5 anos de idade e outro após a quarta década de vida (WOOTEN et al. 1993; DACKIW et al. 2001; ELSE et al. 2014; SABARETNAM et al. 2016). Entretanto, essa característica não foi observada no nosso estudo, onde foi verificado que aproximadamente 80% dos casos eram diagnosticados com idade superior a 40 anos de idade. A ausência da distribuição bimodal foi observada em outros três estudos: na população holandesa (KERKHOF et al. 2013), americana (KEBEBEW et al. 2006) e alemã (FASSNACHT e ALLOLIO 2011).

A incidência anual estimada para o ADR pediátrico é de cerca de 0,3 a 0,4 casos/1 milhão (MICHALKIEWICZ et al. 2004). Contudo, uma incidência anual excepcionalmente alta de ADR pediátrico tem sido relatada em crianças da região Sul e Sudeste do Brasil, com incidências de 3,4-4,2 casos por milhão. A incidência mundial de ADR pediátrico é de 0,3 casos por milhão em crianças com idades inferiores a 15 anos (RIBEIRO et al. 2001; MICHALKIEWICZ et al. 2004; PIANOVSKI et al. 2006).

As taxas de incidência de ADR para os quatro Registros de Câncer de Base Populacional da América Latina (Colômbia, Costa Rica, Brasil e Equador), revelam as maiores taxas em Goiânia. Esses achados corroboram com os dados prévios da literatura que reportam uma alta taxa de incidência desse tumor no Brasil, independente do sexo ou idade do paciente (RIBEIRO et al. 2001; MICHALKIEWICZ et al. 2004; PIANOVSKI et al. 2006).

Pelo fato de ter sido identificada uma característica de distribuição bimodal do ADR em diversos estudos, foi utilizado o modelo Idade-Período-Coorte para avaliar as tendências de idade, ano e coorte de nascimento nas taxas de ADR nos EUA (banco de dados SEER). Os pacientes foram subdivididos em dois grupos: pediátricos (00-19 anos) e adultos (20-84 anos) e as análises foram feitas por períodos de cinco anos de 1973 a 2014.

Para o nosso conhecimento, até o momento nenhum outro estudo foi feito avaliando os efeitos de APC em pacientes com ADR. Esse tipo de análise tem sido considerado extremamente importante nos sistemas de saúde (YANG 2008; REITHER et al. 2009).

Como o ADR é um tumor raro, as taxas identificadas são baixas, ainda assim foi possível notar que são mais altas em crianças de zero a cinco anos de idade. A taxa de coorte entre os nascidos no ano de 1999 foi três vezes maior que nos outros anos. Como a taxa é muito pequena acredita-se que este pode ser um efeito randômico; portanto, não foi considerado o efeito de coorte para o grupo pediátrico. Para o grupo de

pacientes adultos, foi possível notar o aumento das taxas a partir da quarta década de vida, atingindo o seu pico entre a sexta e a sétima décadas.

Embora nossa coorte não tenha apresentado a característica bimodal esperada, foi possível notar que as taxas estão aumentando de zero a cinco anos e após os 40 anos, corroborando com os estudos que atribuem o fator bimodal a esses tumores (ANTONINI et al. 2011; MERMEJO et al. 2014).

É sabido que o tratamento cirúrgico é o mais efetivo para este tipo tumoral, sendo a ressecção completa do tumor a principal estratégia terapêutica que pode curar ou prolongar a sobrevida de forma significativa, principalmente se a doença for detectada em estágios iniciais (I e II). A maioria dos pacientes com estágio III terá recidiva tumoral e doença metastática apesar da ressecção tumoral completa. A sobrevida para esse grupo de pacientes é de 30% em cinco anos e 15%-25% para o estadiamento IV (LATRONICO e CHROUSOS 1997; ANTONINI et al. 2011). Infelizmente, nos dados disponíveis no SEER, aproximadamente 79% dos casos não tinham essa informação disponível, o que inviabilizou os cálculos de sobrevida para essa variável.

A sobrevida geral dos pacientes incluídos na nossa casuística foi de 35% aos cinco anos, resultado este, similar ao encontrado por AYALA-RAMIREZ (38%) em 2013 na população diagnosticada com ADR no MD Anderson, Texas, USA no período de 1998 a 2011. Ademais, esses valores também foram similares ao de diversos outros estudos (KENDRICK et al. 2001; ABIVEN et al. 2006; BILIMORIA et al. 2008, SCOLLO et al. 2016).

Tumores em crianças mais velhas parecem comportar-se de forma semelhante ao ADR adulto, mostrando uma sobrevida global de 5 anos de 30 a 40% (PATON et al. 2006). Na nossa casuística a sobrevida segundo a faixa etária foi calculada com pacientes de 00-19, e, possivelmente, por essa razão a sobrevida obtida na faixa etária pediátrica foi consideravelmente mais alta (56%).

Em 2013 um estudo utilizando os dados do SEER apenas em pacientes pediátricos, subdividiu os pacientes em grupos com <1 ano, 1-4 anos, 5-9 anos, 10-14 anos e 15-19 anos (MCATEER et al. 2013). Os autores mostraram que a sobrevida decrescia significativamente nesses grupos de acordo com a faixa etária, sendo de 90% para os pacientes com < 1 ano e 22,3% para os pacientes entre 15-19 anos.

As diversas diferenças documentadas entre tumores diagnosticados em crianças e adultos levantam a questão da importância da idade como um fator prognóstico independente para o ADR (MCATEER et al. 2013). Apesar de vários estudos analisarem os fatores prognósticos do ADR, principalmente nas crianças, os resultados não têm sido consistentes, e como mostrado em nosso estudo e em outros, nota-se que as crianças mais jovens são as que apresentam uma melhor sobrevida (DEHNER et al. 2003; MICHALKIEWICZ et al 2004; KLEIN et al. 2011).

A sobrevida global dos pacientes de acordo com o sexo foi significativamente maior para os pacientes do sexo feminino (37,2 meses) comparado ao masculino (32,5 meses). Entretanto esse fator pode ser devido a maior incidência desse tumor nos pacientes do sexo feminino. Para

o nosso conhecimento, os relatos em literatura não avaliaram a diferença de sobrevida global considerando o gênero dos pacientes diagnosticados com ADR.

Outra variável com diferença estatística foi a dos pacientes cuja extensão da doença era localizada (60,2%), seguida de regional (39,2%) e distante (5,8%). No entanto em 2013, Ayalla-Ramirez e colaboradores relataram que embora seja útil incluir a extensão da doença na análise de sobrevida, os exames de imagem utilizados ao diagnóstico podem ter sido diferentes como tomografia computadorizada, ressonância magnética, PET SCan (do inglês: *Positron Emission Tomography*) ou cintilografia óssea. Sendo que a ausência de uniformidade no exame de detecção pode influenciar na diferença no número de metástases identificadas, causando assim uma imprecisão nas características doença ao diagnóstico (AYALA-RAMIREZ et al. 2013).

Resultados semelhantes foram encontrados quando a população pediátrica disponível no SEER até 2004 foi avaliada. A sobrevida dos pacientes cuja a extensão da doença era localizada foi de 80,4%, caindo para 24% para os pacientes com doença metastática (MCATEER et al. 2013).

Interessantemente, observou-se uma sobrevida maior nos pacientes de acordo com a década de diagnóstico. Os pacientes que foram diagnosticados em 1970 apresentaram sobrevida de 25,5%, enquanto os pacientes diagnosticados nos anos 2000 apresentaram a sobrevida de 36%. Este achado pode estar diretamente relacionado com a maior precisão

diagnóstica, principalmente com o avanço dos exames de imagem, que corroboram para que haja um diagnóstico mais precoce e preciso.

Até o presente, os estudos epidemiológicos no carcinoma adrenocortical ainda são muito limitados. A principal fonte de dados desse tumor é o SEER, e para o nosso conhecimento, não há outra fonte de dados tão robusta e confiável quanto esta. No Brasil, a incidência do ADR pediátrico chega a ser até 15% maior do que em outras partes do mundo (SANDRINI et al. 1997), mostrando assim a necessidade da criação de um banco de dados com a casuística brasileira o que possibilitaria um maior entendimento a respeito dessa neoplasia.

O ADR pediátrico é frequentemente relacionado com mutações germinativas no gene *TP53*, sendo então fortemente associado com a Síndrome de Li-Fraumeni (WASSERMAN et al. 2012). O ADR pode ser detectado em 6-13% dos pacientes com esta síndrome (BOUGEARD et al. 2015; MAI et al. 2016).

Segundo SEIDINGER et al. (2011), aproximadamente 93% dos pacientes pediátricos são portadores da mutação fundadora *TP53*, a p.R337H, a qual consiste na troca de uma arginina por uma histidina (RIBEIRO et al. 2001). A associação de mutações no gene *TP53* com o ADR é tão forte que mesmo crianças com aparente ADR esporádico apresentam uma alta prevalência de mutações nesse gene (VALDEZ et al. 2017).

Por isso, na segunda etapa deste estudo, o principal objetivo foi identificar alterações genômicas com potencial para evidenciar novos marcadores moleculares para promover uma compreensão mais robusta a

respeito do ADR pediátrico. Considerando a raridade da doença, foram estabelecidas diversas colaborações as quais puderam contribuir com a disponibilidade de amostras FFPE. A utilização de amostras FFPE é sempre um desafio, uma vez que a qualidade do material desejado (DNA ou RNA) dependerá de diversos fatores, como o tempo entre a retirada do tumor e a fixação da amostra em parafina, tempo de fixação da amostra e a qualidade do fixador utilizado. O tamanho da peça também é um fator importante, uma vez que é sabido que em tumores maiores a parafina demora mais para chegar ao centro do tumor, podendo dessa forma causar degradação do tecido (GILBERT et al. 2007; ZHANG et al. 2017).

A coorte inicial selecionada para esta parte do estudo era composta por 37 pacientes, com maior proporção de pacientes do sexo feminino (22/37) corroborando com os relatos já descritos em literatura (ICARD et al. 2001; MICHALKIEWICZ et al. 2004; CUSTODIO et al. 2013; BULZICO et al. 2016; SCOLLO et al 2016; TELLA et al. 2018). Para o nosso conhecimento, até o presente momento, não há explicações em literatura da maior prevalência doença em indivíduos do sexo feminino.

A idade média dos pacientes foi de 13,22 anos, diferindo do primeiro pico de incidência do ADR (até os 5 anos) quando consideramos a distribuição bimodal frequentemente atribuída a esse tumor (ELSE et al. 2014; SABARETNAM et al. 2016). Oito dos 37 pacientes estavam fora dos picos esperados de idade de acometimento (até os 5 anos e após a quarta década de vida), e desses, quatro eram positivos para mutação p.R337H

(média de idade de 13,7 anos) e os outros quatro eram negativos para a mutação (média de idade de 21,2 anos).

Recentemente, uma análise clinicopatológica incluindo 41 pacientes pediátricos diagnosticados no *Mayo Clinic* - EUA, mostraram que há fortes evidências de que o curso natural do ADR é significativamente diferente e favorável em crianças com idades inferiores a 4 anos em comparação com aqueles com mais de 12 anos de idade. Entretanto testes genéticos não foram realizados, portanto não foram obtidas conclusões a respeito da associação das mutações em *TP53* com o ADR (GUPTA et al 2018).

Uma das limitações do presente estudo foi a qualidade das amostras. Entre as 37 amostras selecionadas, 22 tinham DNA com qualidade e em quantidade suficiente para os ensaios de *CytoScan*, mas apenas 12 passaram pelos critérios de qualidade recomendados pelo fabricante. Ainda assim, somente sete amostras (três *TP53* p.R337 positivas e quatro *TP53* p.R337 negativas) apresentaram qualidade satisfatória para as análises.

Entre as amostras positivas para a mutação *TP53* p.R337H foram compartilhados entre os três tumores ganhos de praticamente todo o cromossomo 1, cnLOH no cromossomo 11 e perda do cromossomo 17. Em 2012, LETOUZÉ et al. avaliaram 25 ADRs pediátricos, sendo 13 casos provenientes do Brasil (todos portadores da mutação p.R337H) e 12 de outras partes do mundo (França, Suíça, Holanda e Estados Unidos) incluindo portadores da p.R337H, outras mutações em *TP53* e *TP53* selvagem. Os autores descreveram 16 alterações cromossômicas significativamente recorrentes em ADR pediátrico, incluindo ganhos no

cromossomo 1 (1p13-1q23), cnLOH no cromossomo 11 (11p15) e perda no cromossomo 17 (17p11-17q12), dados estes que corroboram com os nossos achados.

Em dois dos três casos positivos para a mutação foi observada a perda em 17p13.3 onde se mapeia o gene *DOC2BL*. Interessantemente, esta mesma alteração foi identificada em um paciente da coorte do estudo de LETOUZÉ et al. (2012) e que não era portador da mutação p.R337H.

Há poucos estudos que avaliaram alterações genômicas em pacientes pediátricos com ADR, no entanto existem alguns que analisaram o perfil genômico de carcinomas e adenomas adrenocorticais. Em 2013, RONCHI et al. (2013) avaliaram 46 tumores adrenocorticais, sendo 24 adenomas e 22 carcinomas. Utilizando a técnica de hibridação genômica comparativa (HGC), um estudo identificou alterações com ganhos nos cromossomos 4, 5, 12, e 19 e perdas em 1p, 17p, 22p, 11q e 2q em 62% dos casos. Os autores identificaram que nos carcinomas existia um padrão genético preciso incluindo perdas no cromossomo 1, o que foi associado a um melhor prognóstico. Na nossa casuística, diferentemente de RONCHI et al. (2013) nós identificamos ganhos no cromossomo 1, interessantemente um dos três pacientes que tinha o ganho no chr 1 ao invés da perda, veio a óbito, mas apenas isso não é suficiente para afirmarmos que nossos achados associam esse fato a um pior prognóstico.

A perda envolvendo 17q (start: 34071799- end: 42761941) foi observada em todos os casos positivos para a mutação p.R337H. Nessa região estão mapeados diversos genes, destacando-se o *BRCA1* (17q21.31)

e *TOP2A* (17q21.2) Em uma análise do perfil de expressão gênica em amostras de tumores adrenocorticais (adenomas e carcinomas) da infância, WEST et al. (2007) relataram expressão aumentada do gene *TOP2A*. O perfil de expressão gênica entre carcinomas e adenomas adrenocorticais relatado por FERNANDEZ-RANVIER et al. (2008) também revelou aumento de expressão do gene *TOP2A*. JAIN et al. (2013) confirmaram a expressão aumentada do gene *TOP2A* em carcinomas adrenocorticais quando comparados à adenomas e tecidos normais. Os autores sugeriram que esse gene é um potencial alvo terapêutico para o carcinoma adrenocortical (JAIN et al. 2013). Nesses estudos, os autores não avaliaram a presença de mutações no gene *TP53*. Em nosso estudo, os casos negativos para pR337H tinham cnLOH nessa região o que poderia levar a duplicação do gene e conseqüente aumento da sua expressão. Entretanto, não foi possível avaliar a presença da expressão desse gene entre as amostras testadas. Baseados nos dados da literatura e em nossos achados, pode ser sugerido que ganhos do gene *TOP2A* possam ser traduzidos para aumento de sua expressão e que esse evento contribui para a carcinogênese da adrenal.

Em adição, os casos positivos para a mutação *TP53* p.R337 apresentaram ganhos no cromossomo 3 (start 61891- end 62613) (ADR-14) e em Xq26.3 (ADR-17), o que não foi encontrado em nenhum caso negativo para a mutação. Usando uma abordagem diferente da descrita no presente estudo, RUSSELL et al. (1999) compararam adenomas e carcinomas sendo detectados resultados semelhantes aos aqui descritos. Os autores identificaram ganhos no cromossomo 3 nos carcinomas adrenocorticais

assim como ganhos no cromossomo X (RUSSELL et al. 1999, como os aqui descritos).

Na nossa casuística, os casos negativos para mutações no gene *TP53* apresentaram maior número de alterações quando comparados aos positivos. Este resultado diferiu dos descritos por LETOUZÉ et al. (2012). Nesse estudo, os pacientes eram portadores de mutações no gene *TP53*, incluindo a p.R337H e apresentaram um número significativamente maior de alterações quando comparados com os casos *TP53* selvagem (LETOUZÉ et al. 2012).

A combinação de cromossomos com um alto número de CNAs incluindo amplificações envolvendo grandes regiões genômicas nos cromossomos 5, 7, 12 e 19 assim como grandes deleções nos cromossomos 1, 2, 13, 17 e 22 foi associada com um melhor prognóstico nos pacientes com ADR (RONCHI et al. 2013). Na presente casuística, dentre os pacientes negativos para a mutação p.R337H, foram identificados ganhos nos cromossomos 5,7, 12, 15 e 20, um padrão bem parecido ao descrito pelos autores. Interessantemente os quatro casos que apresentaram essa combinação de alterações estão vivos e bem, ainda que o padrão de deleções não tenha sido exatamente o mesmo.

Nos últimos anos, análises de três estudos com coortes independentes de ADR identificaram perfis comuns de alterações cromossômicas (CNAs: *Copy Number Alterations*) (ASSIE et al 2014; JUHLIN et al. 2015; ZHENG et al. 2016).

Amplificações específicas foram observadas nas regiões cromossômicas contendo o gene *TERT* (5p15.33), o qual codifica a transcriptase reversa da telomerase, e o gene *CDK4* (12q14); sua proteína compõe a via do ciclo celular. Na nossa casuística, ainda que não tenha sido na mesma regiões, os casos negativos para a mutação p.R337H apresentaram ganhos nos cromossomos 5 e 12.

Por outro lado, as deleções foram mais comumente observadas no cromossomo 22, onde se mapeia o gene *ZNRF3* (22q12.1), e nos cromossomos 9 e 13, contendo os genes *CDKN2A* (9p21.3) e *RB1* (13q14), respectivamente (ARMIGNACCO et al. 2017). Entretanto, na nossa casuística três dos quatro pacientes negativos para mutações no gene *TP53* apresentaram ganhos no cromossomo 13, na região codificada pelo gene *GPC6*. Ademais, apesar de três estudos traçarem esse perfil de alterações, todos eles foram realizados em uma coorte com média de idade acima da quarta década de vida, 52,9 anos (JUHLIN et al. 2015) e 49 anos (ZHENG et al. 2016), enquanto que a média de idade para o nosso estudo foi de 4,8 anos.

Os casos negativos para mutações no gene *TP53* também apresentaram em comum uma cnLOH mapeada em 17p13.3-q25.3 (start: 33950977 - end: 43051391). Interessantemente, PINTO et al. (2015) relataram uma associação entre a cnLOH em todo o cromossomo 17 em pacientes portadores de mutações no gene *TP53*. Nesse estudo, os autores encontraram cnLOH no cromossomo 17 em 28 de 37 ADR pediátricos e os tumores que tinham mutações germinativas no gene *TP53* apresentaram

cnLOH envolvendo todo o cromossomo 17. Os autores sugeriram que os pacientes portadores da mutação p.R337H, apresentavam um segundo evento, como por exemplo cnLOH concomitante nos cromossomos 11 e 17p. Nossos achados sugerem que a cnLOH envolvendo o cromossomo 17 está associada ao desenvolvimento do ADR e, provavelmente, não diretamente relacionada com presença ou ausência de mutações no gene *TP53*.

Nesse mesmo estudo, PINTO et al. (2015) relataram a presença de cnLOH do cromossomo 11p, com seleção contra o cromossomo materno e consequente expressão aumentada de *IGF2*, como um evento precoce e um marco da tumorigênese adrenocortical pediátrica. O grupo, propôs que mutações germinativas no gene *TP53* podem contribuir para a tumorigênese adrenocortical promovendo a instabilidade cromossômica. Ademais, neste relato, os autores identificaram alterações em 11p e expressão aumentada de *IGF2* em todos os casos de ADR com mutações germinativas no gene *TP53*. A cnLOH em 11p e alterações na expressão de *IGF2* já foram associadas a outros tumores pediátricos, como tumor de Wilms, e hepatoblastoma (RAINIER et al. 1993, MUSSA et al. 2011), fato este que também foi observado nos carcinomas adrenocorticais, que apresentam alterações de *imprinting* genômico no cromossomo 11p15 (ASSIE et al. 2014). PINTO et al. (2015), encontraram a perda de heterozigose do cromossomo 11p em 91% dos casos testados. Além disso, foi observada a cnLOH do cromossomo 17 com seleção contra o *TP53* selvagem em 76% dos tumores adrenocorticais. Segundo os autores, a cnLOH em 11p e 17

ocorreu durante o início da tumorigênese, sugestivo de que estes eventos estão associados com o desenvolvimento tumoral. Nossos achados, ainda que tenham sido feitos por uma abordagem diferente, corroboram com os achados de PINTO et al. (2015) todos os nossos casos, independentemente de serem positivos ou negativos para a mutação p.R337H, apresentaram cnLOH em 11p. Em nosso estudo, não foi possível avaliar a expressão de *IGF2*.

Em 2016, ZHENG et al. relataram como a cnLOH pode estar associada com uma duplicação do genoma completo (WGD), que se associa à agressividade do tumor, sugerindo que WGD pode representar um marcador de progressão tumoral.

Dentre as outras alterações identificadas somente nos casos com ausência de mutações no gene *TP53*, destacam-se alterações nos cromossomos 16 e 21 que apresentaram um maior número de genes envolvidos. Em relação aos genes alterados no cromossomo 16, encontram-se marcadores de diferenciação celular, fatores de transcrição, oncogene e supressor tumoral. Como exemplo, o oncogene *CREBBP* está envolvido na co-ativação transcricional de muitos fatores de transcrição diferentes e alterações nesse gene são fortemente associadas leucemia linfoblástica aguda em crianças (DING et al. 2017). Enquanto o supressor tumoral *TSC2* já foi associado com câncer de células renais em idade pediátrica (POTTER et al. 2017) e tumores neuroendócrinos (SCHRADER et al. 2017).

As alterações genômicas que diferenciavam os tumores positivos e negativos para a mutação envolveram os cromossomos 1, 7 e 17. No nosso

estudo, o principal processo biológico identificado como alterado foi relacionado a via da MAPK. Sabe-se que a MAPK é regulada pela via Wnt/ β catenina, que é essencial para o desenvolvimento embrionário da adrenal e que está envolvida na tumorigênese dessa glândula (BERTHON et al. 2012; SIMON e HAMMER 2012). Desta forma, as alterações envolvendo os genes da via MAPK podem contribuir para o desenvolvimento dos carcinomas adrenocorticais.

Em 2015, um estudo investigou o *status* mutacional dos genes que codificam a via de sinalização da MAPK, tais como *BRAF*, *HRAS*, *NRAS*, *KRAS* e *EGFR* em um grupo de 95 ADRs. Foram identificadas duas diferentes alterações em *BRAF* (c.1332G>A;p.R444R) no exon 11 e (c.1799T>A, p.V600E) no exon 15. Embora tenha sido observado em nosso estudo alterações nos cromossomos 11 e 15, o gene *BRAF* não estava entre os alterados ou mesmo outros genes da via MAPK (RUBIN et al. 2015).

Em resumo, os resultados da análise de SNP array mostraram que pacientes portadores da mutação p.R337H do gene *TP53* apresentam tumores com um menor número de alterações quando comparados com os tumores de pacientes não mutados. Foram descritas alterações genômicas específicas entre os casos com e sem a mutação no gene *TP53* revelando um perfil genômico particular para cada grupo de tumores. Estes achados dão suporte para a hipótese que estes tumores são biologicamente e molecularmente distintos podendo explicar as diferenças clínicas previamente relatadas nestes pacientes.

Na terceira parte do estudo, foi possível analisar dados do

sequenciamento do genoma de três pacientes, um pediátrico e dois adultos, com ADR que foram previamente identificados como portadores da mutação fundadora p.R337H.

Interessantemente a paciente que apresentou o maior número de alterações foi a paciente diagnosticada em idade mais avançada, ademais, esta paciente declarou-se como fumante compulsiva. Em 1996 HSING et al. sugeriram um aumento do risco de desenvolvimento de ADR em fumantes pesados do sexo masculino (razão de risco 2.0, IC 95% 1.0-4.4), mas não em fumantes do sexo feminino (HSING et al. 1996). O aumento do risco para fumantes do sexo masculino também foi visto em outra série em 250.000 veteranos dos EUA (CHOW et al 1996). Além disso, um pequeno estudo em ratos descreveu o desenvolvimento de três ADRs em 80 ratos que foram expostos à inalação crônica de tabaco em comparação com nenhum caso nos 93 controles (DALBEY et al. 1980). No entanto, a avaliação desses estudos deve ser analisada com cautela pois em nenhum dos casos o ADR foi confirmado por exames histológicos. KUPER et al. (2002) fez uma revisão do uso de tabaco e a causa do câncer, e julgou que as evidências disponíveis sobre uma possível associação entre o tabagismo e o ADR eram inconclusivas.

A paciente, ADR-31, desenvolveu um linfoma de Hodgkin aos sete anos de idade, e recebeu quimioterapia e radioterapia local. A taxa de desenvolvimento de múltiplos tumores primários em pacientes com linfoma de Hodgkin tem sido reportada de 7,5% (WEIR et al. 2013) a 7,8% (BHULLER et al. 2016), e tem sido principalmente associada aos efeitos

tóxicos tardios devido ao tratamento (VOGT et al. 2017). Os pacientes que sobreviveram ao linfoma de Hodgkin que foram tratados com radioterapia, apresentam maior risco de desenvolvimento de cânceres de mama, pulmão, tireóide e coloretal (LISIK-HABIB et al. 2015; BHULLER et al. 2016). Já os pacientes que trataram com quimioterapia estão mais suscetíveis ao desenvolvimento de leucemias secundárias, cânceres de pulmão, gastrointestinal ou bexiga, assim como sarcomas de partes moles e osteosarcomas (WOOD et al. 2012). Não pode ser descartada a possibilidade desta paciente ter desenvolvido o ADR, um segundo tumor primário, também como resultado do tratamento quimioterápico.

Os cromossomos mais frequentemente alterados nos três pacientes avaliadas por NGS, foram os cromossomos 1, 11, 16, 17 e 19. Diversos estudos já relacionaram a relação de alterações nos cromossomos 11 e 17 com o desenvolvimento do ADR (WEST et al. 2007; JAIN et al. 2013; PINTO et al. 2015). No entanto, considerando as ferramentas de predição (SIFT e Poly-Phen-2) utilizadas nesse estudo, várias alterações envolvendo diversos genes foram consideradas prejudiciais embora ainda não tenham sido descritas no carcinoma adrenocortical.

Em 2014, o *The European Newtwork for the Study of Adrenal Tumors-ENSAT* descreveu o primeiro perfil genômico de ADR baseado nas análises de exoma e SNP-array, comparando mutações tumorais somáticas e o perfil germinativo (ASSIE et al. 2014). Pouco tempo depois, os dados foram confirmados pelos dois outros estudos utilizando coortes independentes de ADR (JUHLIN et al. 2015; ZHENG et al. 2016), resultando em validação de

uma lista de genes *drivers*.

JUHLIN et al. (2015) relataram que as mutações potencialmente causadoras da doença afetam os genes *GNAS*, *RB1* e *NF2*. Destes três genes, nós identificamos apenas uma alteração no gene *GNAS* (p.Glu52Lys) no caso ADR-31. Ainda que a alteração não seja idêntica reportada no estudo de JUHLIN et al. (2015) (Arg201Hist), torna-se interessante uma investigação mais detalhada do gene *GNAS* em ADR. Mutações localizadas no éxon 8 do gene *GNAS* resultam na síndrome de McCune-Albright. Os indivíduos afetados com essa síndrome apresentaram uma maior predisposição para o desenvolvimento da Síndrome de Cushing, que é altamente relacionada ao ADR (WEINSTEIN et al. 1991; GOUDIE et al. 2018).

Nos três estudos descrevendo alterações no ADR, o gene *ZNFR3* foi o mais comumente alterado (21% nos três estudos), juntamente com mutações no gene que codifica a beta catenina *CTNNB1* (16%) (ASSIE et al. 2014; JUHLIN et al. 2015; ZHENG et al. 2016). Mutações nesses genes foram consideradas como exclusivas do ADR nos três estudos (ARMIGNACCO et al. 2017). Interessantemente, nenhum dos três casos aqui analisados apresentou alterações nesses genes. No entanto, ESPIARD e BERTHERAT (2015) associaram mutações somáticas nos genes (*ZNFR3* e *CTNNB1*) apenas com casos de ADR esporádicos, o que explicaria a ausência de mutações nesses genes na nossa casuística.

Os estudos disponíveis até o presente realizaram análises de sequenciamento em tumores adrenocorticais, visando a comparação do

perfil mutacional de carcinomas e adenomas. O grande diferencial do nosso estudo, é que o mesmo foi realizado visando a comparação entre carcinomas adrenocorticais, positivos para mutação fundadora p.R337H, embora em diferentes idades de acometimento. Duas alterações estavam presentes nos dois ADR adultos: *FMN1* (p.R560C) e *PRAMEF4* (p.D85N). A expressão do gene *PRAMEF4* foi identificada em colangiocarcinoma e cânceres de fígado, ovário, endométrio e testículo (LI et al. 2016). Não temos conhecimento de outros relatos sobre esses dois genes no ADR.

Considerando o caso ADR-31, diversas alterações foram identificadas exclusivamente no tumor pediátrico, dentre elas, uma variante no gene *ATRX* (p.R663H). O gene *ATRX* codifica uma helicase que atua no remodelamento da cromatina e na manutenção estrutural dos telômeros (CLYNES et al. 2013). PINTO et al. (2015) relataram que os casos com mutações germinativas no *TP53* e somáticas em *ATRX* foram significativamente associados com tumores maiores, de estadiamento avançado (III/IV) e com uma sobrevida livre de doença ruim. No nosso caso, a paciente foi operada em outro serviço e nos prontuários não constam o estadiamento e tamanho do tumor. No entanto, a sobrevida livre de doença dela foi ruim, uma vez que ela desenvolveu uma série de sarcomas de partes moles (aos 10, 12, 14, 16 anos) após o tratamento do ADR. Aos 20 anos, esta paciente desenvolveu um sarcoma de partes moles no braço e veio a óbito, menos de um ano após o diagnóstico devido a metástase pulmonar.

Outros genes que aparecem frequentemente mutados nos ADR são

CDKN2A, *RB1*, *MDM2* e em uma menor frequência os genes *MEN1*, *DAXX* e *TERT* (ARMIGNACCO et al. 2017). Na nossa casuística, não foi identificada alteração nestes genes, tais genes tem sido mais comumente associados com ADR esporádico e provavelmente por isso não foram encontrados no nosso estudo.

Recentemente, VATRANO et al. (2018) identificaram que o perfil mutacional dos ADR era diferente nos distintos tipos histológicos do ADR, apresentando uma alta prevalência de alterações somáticas nos casos cuja a histopatologia era convencional comparado com os casos oncocíticos. Infelizmente, não foi possível obter os dados histopatológicos dos tumores da nossa casuística.

Para o nosso conhecimento, não há relatos em literatura das variantes patogênicas identificadas em nosso estudo (classificação do Intervar), exceto a descrita no gene *TP53*, cuja associação com o ADR já é bem estabelecida. As alterações nos genes *HBB*, *MSR1*, *SH3TC2*, *LSS* e *ABCA4*, ainda que tenha sido identificadas em poucos casos, podem estar relacionadas com esse tipo tumoral. Portanto, há a necessidade de uma coorte mais robusta para investigar e validar os resultados aqui obtidos.

No entanto, frente a raridade do tumor, o maior desafio é conseguir amostras suficientes para que possamos confirmar esses achados e, dessa forma, associar ou não essas alterações ao ADR.

6 CONCLUSÃO

- Os análises epidemiológicas utilizando o SEER mostrou que o ADR é uma neoplasia rara nos Estados Unidos da América com a grande maioria dos casos apresentando-se em estadios avançados e acometendo indivíduos em idades mais avançadas. Além disso, os dados revelaram maior sobrevida tanto para os pacientes diagnosticados até os 19 anos de idade, quanto para os pacientes cuja a extensão da doença era localizada;
- A taxa de incidência de ADR nos EUA apresentou um aumento até a década de 1990 e permaneceu estável após esse ano. As taxas de incidência da doença em indivíduos nas faixas etárias mais avançadas estão aumentando. Não houve evidências de efeito de coorte na população avaliada;
- Apesar do pequeno número amostral avaliado por SNP array, foi possível observar que os pacientes portadores da mutação *TP53* p.R337H apresentaram níveis de instabilidade cromossômica menores quando comparados aos pacientes que são negativos para a mesma mutação;

- O perfil genômico dos pacientes com a mutação p.R337H mostrou-se distinto dos casos sem a mutação;
- Foram identificadas alterações em genes previamente associados ao desenvolvimento do ADR, como o *GNAS* e o *ATRX* . Além disso, foram detectadas alterações em genes ainda não associados com essa neoplasia. Estas variantes tem potencial para contribuir para o risco de desenvolvimento do ADR, no entanto são necessários estudos em uma coorte mais robusta e pareados por idade;
- Considerando a raridade do tumor, principalmente quando se trata de pacientes LFS, torna-se evidente a necessidade de colaborações com um maior número de centros de referência no Brasil para que seja analisada uma grande coorte de casos e que conclusões mais definitivas sejam ser obtidas. Desta forma, seria possível melhor entender o papel da mutação p.R337H no processo carcinogênico da adrenal.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abiven G, Coste J, Groussin L, et al. Clinical and biological features in the prognosis of adrenocortical cancer: poor outcome of cortisol-secreting tumors in a series of 202 consecutive patients. **J Clin Endocrinol Metab** 2006; 91:2650-5.

Achatz MI, Olivier M, Le Calvez F, et al. The TP53 mutation, R337H, is associated with Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-like syndromes in Brazilian families. **Cancer Lett** 2007; 245:96-102.

Achatz MI, Zambetti GP. The Inherited p53 Mutation in the Brazilian Population. **Cold Spring Harb Perspect Med** 2016; 1:12.

Amadou A, Waddington Achatz MI, Hainaut P. Revisiting tumor patterns and penetrance in germline TP53 mutation carriers: temporal phases of Li-Fraumeni syndrome. **Curr Opin Oncol** 2017; 30:23-29.

Antonini SRR, Colli LM, Ferro L, Mermejo L, Castro M. Tumores adrenocorticais na criança: da abordagem clínica à avaliação molecular. **Arq Bras Endocrinol Metab** 2011; 55:599-606.

Aparicio S, Eaves CJ. p53: a new kingpin in the stem cell arena. **Cell** 2009; 138:1060-2.

Armignacco R, Cantini G, Canu L, et al. Adrenocortical carcinoma: the dawn of a new era of genomic and molecular biology analysis. **J Endocrinol Invest** 2017; 41:499-507.

Assie G, Letouze E, Fassnacht M, et al. Integrated genomic characterization of adrenocortical carcinoma. **Nat Genet** 2014; 46:607-12.

Assumpção JG, Seidinger AL, Mastellaro MJ, et al. Association of the germline TP53 R337H mutation with breast cancer in southern Brazil. **BMC Cancer** 2008; 8:357.

Aubrey BJ, Strasser A, Kelly GL. Tumor-Suppressor Functions of the TP53 Pathway. **Cold Spring Harb Perspect Med** 2016; 6:a026062.

Ayala-Ramirez M, Jasim S, Feng L, et al. Adrenocortical carcinoma: clinical outcomes and prognosis of 330 patients at a tertiary care center. **Eur J Endocrinol** 2013; 169:891-9.

Berthon A, Martinez A, Bertherat J, Val P. Wnt/ β -catenin signalling in adrenal physiology and tumour development. **Mol Cell Endocrinol** 2012; 351:87-95.

Bhuller KS, Zhang Y, Li D, et al. Late mortality, secondary malignancy and hospitalisation in teenage and young adult survivors of hodgkin lymphoma: report of the childhood/adolescent/young adult cancer survivors research program and the BC cancer agency centre for lymphoid cancer. **Br J Haematol** 2016, 172:757-68.

Bilimoria KY, Shen WT, Elaraj D, et al. Adrenocortical carcinoma in the United States: treatment utilization and prognostic factors. **Cancer** 2008; 113:3130-6.

Birch JM, Hartley AL, Tricker KJ, et al. Prevalence and diversity of constitutional mutations in the p53 gene among 21 Li-Fraumeni families. **Cancer Res** 1994; 54:1298-304.

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

Bland ML, Desclozeaux M, Ingraham HA. Tissue growth and remodeling of the embryonic and adult adrenal gland. **Ann N Y Acad Sci** 2003; 995:59-72.

Bonnet S, Gaujoux S, Launay P, et al. Wnt/beta-catenin pathway activation in adrenocortical adenomas is frequently due to somatic CTNNB1-activating mutations, which are associated with larger and nonsecreting tumors: a study in cortisol-secreting and -nonsecreting tumors. **J Clin Endocrinol Metab** 2011; 96:E419-E26.

Bouaoun L, Sonkin D, Ardin M, et al. TP53 Variations in Human Cancers: New Lessons from the IARC TP53 Database and Genomics Data. **Hum Mutat** 2016; 37:865-76.

Bougeard G, Renaux-Petel M, Flaman JM, et al. Revisiting Li-Fraumeni Syndrome from TP53 mutation carriers. **J Clin Oncol** 2015; 33:2345-52.

Bulzico D, de Faria PA, de Paula MP, et al. Recurrence and mortality prognostic factors in childhood adrenocortical tumors: analysis from the Brazilian National Institute of Cancer experience. **Pediatr Hematol Oncol** 2016; 4:248-58.

Chompret A, Brugières L, Ronsin M, et al. P53 germline mutations in childhood cancers and cancer risk for carrier individuals. **Br J Cancer** 2000; 12:1932-7.

Choong SS, Latiff ZA, Mohamed M, et al. Childhood adrenocortical carcinoma as a sentinel cancer detecting families with germline TP53 mutations. **Clin Genet** 2012; 82:564-8.

Chow WH, Hsing AW, McLaughlin JK, Fraumeni JF Jr. Smoking and adrenal cancer mortality among United States veterans. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 1996; 5:79-80.

Cibulskis K, Lawrence MS, Carter SL, et al. Sensitive detection of somatic point mutations in impure and heterogeneous cancer samples. **Nat Biotechnol** 2013; 31:213-9.

Cicalese A, Bonizzi G, Pasi CE, et al. The tumor suppressor p53 regulates polarity of self-renewing divisions in mammary stem cells. **Cell** 2009; 138:1083-95.

Cingolani P, Platts A, Wang le L, et al. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3. **Fly (Austin)** 2012; 6:80-92.

Clynes D, Higgs D, Gibbons RJ. The chromatin remodeller ATRX: a repeat offender in human disease. **Trends Biochem** 2013; 38:461-6.

Curado MP, Edwards BK, Shin HR, et al. **Cancer incidence in five continents**. Vol IX. Lyon: IARC Press; 2007. Central and South America; p.111-22.

Custodio G, Parise GA, Kiesel Filho N, et al. Impact of neonatal screening and surveillance for the TP53 R337H mutation on early detection of childhood adrenocortical tumors. **J Clin Oncol** 2013; 31:2619-26.

Dackiw AP, Lee JE, Gagel RF, Evans DB. Adrenal cortical carcinoma. **World J Surg** 2001; 25:914-26.

Dalbey WE, Dalbey WE, Nettesheim P, Griesemer R, Caton JE, Guerin MR. Chronic inhalation of cigarette smoke by F344 rats. **J Natl Cancer Inst** 1980; 64:383-90.

Dehner LP. Pediatric adrenocortical neoplasms: on the road to some clarity. **Am J Surg Pathol** 2003; 27:1005-7.

Dehner LP, Hill DA. Adrenal cortical neoplasms in children: why so many carcinomas and yet so many survivors? **Pediatr Dev Pathol** 2009; 284-91.

Dey A, Lane DP, Verma CS. Modulating the p53 pathway. **Semin Cancer Biol** 2010; 20:3-9.

Dhillon AS, Hagan S, Rath O, Kolch W. MAP kinase signalling pathways in cancer. **Oncogene** 2007; 22:3279-90.

Di Giammarino EL, Lee AS, Cadwell C, et al. A novel mechanism of tumorigenesis involving pH-dependent destabilization of a mutant p53 tetramer. **Nat Struct Biol** 2002; 9:12-6.

Ding LW, Sun QY, Tan KT, et al. Mutational landscape of pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Cancer Res** 2017; 2:390-400.

Eeles RA. Germline mutations in the TP53 gene. **Cancer Surv** 1995; 25:101-24.

Ehrlich PF, Anderson JR, Ritchey ML. et al. Clinicopathologic findings predictive of relapse in children with stage III favorable-histology Wilms tumor. **J Clin Oncol** 2013; 9:1196-01.

El Wakil A, Doghman M, Latre De Late P, Zambetti GP, Figueiredo BC, Lalli E. Genetics and genomics of childhood adrenocortical tumors **Mol Cellular Endocrinol** 2011; 2:169-73.

Else T, Kim AC, Sabolch A, et al. Adrenocortical carcinoma. **Endocr Rev** 2014; 35:282-326.

Espiard S, Bertherat J. The genetics of adrenocortical tumors. **Endocrinol Metab Clin North Am** 2015; 44:311-34.

Fassnacht M, Allolio B. Clinical management of adrenocortical carcinoma. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab** 2009; 23:273-89.

Fassnacht M, Allolio B. Epidemiology of adrenocortical carcinoma. In: Hammer GD, Else T, editors. **Adrenocortical carcinoma: basic science and clinical concepts**. New York: Springer; 2011. p.23-9.

Feng Z, Lin M, Wu R. The regulation of aging and longevity: a new and complex role of p53. **Genes Cancer** 2011; 2:443-52.

Ferlay J, Bray F, Steliarova-Foucher E, Forman D. **Cancer incidence in five continents, CI5plus**. 2014. Available from: <URL:<http://ci5.iarc.fr>> [2018 abr 12]

Fernandez-Ranvier GG, Weng J, Yeh RF, et al. Identification of biomarkers of adrenocortical carcinoma using genomewide gene expression profiling. **Arch Surg** 2008; 143:841-6.

Figueiredo BC, Sandrini R, Zambetti GP, et al. Penetrance of adrenocortical tumours associated with the germline TP53 R337H mutation. **J Med Genet** 2006; 43:91-6.

Forman D, Bray F, Brewster D, et al. **Cancer incidence in five continents**. Vol X. Lyon: IARC Press; 2013. Central and South America; p.42-90.

Forbes SA, Beare D, Bindal N, et al. COSMIC: high-resolution cancer genetics using the catalogue of somatic mutations in Cancer. **Curr Protoc Hum Genet** 2016; 91:10.11.1-10.11.37.

Frebourg T, Malkin D, Friend S. Cancer risks from germ line tumor suppressor gene mutations. **Princess Takamatsu Symp** 1991; 22:61-70.

Gambino V, De Michele G, Venezia O, et al. Oxidative stress activates a specific p53 transcriptional response that regulates cellular senescence and aging. **Aging Cell** 2013; 12:435-45.

Garritano S, Gemignani F, Palmero EI, et al. Detailed haplotype analysis at the TP53 locus in p.R337H mutation carriers in the population of Southern Brazil: evidence for a founder effect. **Hum Mutat** 2010; 31:143-50.

Gaujoux S, Mihai R, joint working group of ESES and ENSAT European Society of Endocrine Surgeons (ESES) and European Network for the Study of Adrenal Tumours (ENSAT) recommendations for the surgical management of adrenocortical carcinoma. **Br J Surg** 2017; 104:358-376

Giacomazzi J, Selistre SG, Rossi C, et al. Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-like syndrome among children diagnosed with pediatric cancer in Southern Brazil. **Cancer** 2013; 24:4341-9.

Giacomazzi J, Graudenz MS2, Osorio CA, et al. Prevalence of TP53 p.R337H mutation in breast cancer patients in Brazil. **PLoS One** 2014; 9:e99893.

Gilbert MT, Haselkorn T, Bunce M, et al. The isolation of nucleic acids from fixed, paraffin-embedded tissues-which methods are useful when? **PLoS One** 2007; 2:e537.

Golden SH, Robinson KA, Saldanha I, Anton B, Ladenson PW. Clinical review: prevalence and incidence of endocrine and metabolic disorders in the United States: a comprehensive review. **J Clin Endocrinol Metab** 2009; 94:1853-78.

Gonzalez KD, Buzin CH, Noltner KA, et al. High frequency of de novo mutations in Li-Fraumeni syndrome. **J Med Genet** 2009, 10:689-93.

Goudie C, Hannah-Shmouni F, Kavak M, Stratakis CA, Foulkes WD. 65 years of the double helix: endocrine tumour syndromes in children and adolescents. **Endoc Relat Cancer** 2018; 25:T221-T44.

Guha T, Malkin D. Inherited TP53 Mutations and the Li-Fraumeni Syndrome. **Cold Spring Harb Perspect Med** 2017; 3:7.

Gupta N, Rivera M, Novotny P, Rodriguez V, Bancos I, Lteif A. Adrenocortical Carcinoma in Children: A Clinicopathological Analysis of 41 Patients at the Mayo Clinic from 1950 to 2017. **Horm Res Paediatr** 2018; 25:1-11.

Hainaut P. Tumor-specific mutations in p53: the acid test. **Nat Med** 2002; 8:21-3.

Hisada M, Garber JE, Fung CY, Fraumeni JF Jr, Li FP. Multiple primary cancers in families with Li-Fraumeni syndrome. **J Natl Cancer Inst** 1998; 90:606-11.

Hsing AW, Nam JM, Co Chien HT, McLaughlin JK, Fraumeni JF Jr. Risk factors for adrenal cancer: an exploratory study. **Int J Cancer** 1996; 65:432-6.

Icard P, Goudet P, Charpenay C, et al. Adrenocortical carcinomas: surgical trends and results of a 253-patient series from the French Association of Endocrine Surgeons study group. **World J Surg** 2001; 25:891-7.

Jain M, Zhang L, He M, Zhang YQ, Shen M, Kebebew E. TOP2A is overexpressed and is a therapeutic target for adrenocortical carcinoma. **Endocr Relat Cancer** 2013; 20:361-7.

Jones S, Anagnostou V, Lytle K, et al. Personalized genomic analyses for cancer mutation discovery and interpretation. **Sci Transl Med** 2015; 7:283ra53.

Juhlin CC, Goh G, Healy JM, et al. Whole-exome sequencing characterizes the landscape of somatic mutations and copy number alterations in adrenocortical carcinoma. **J Clin Endocrinol Metab** 2015; 100:E493-E502.

Kato S, Han SY, Liu W, et al. Understanding the function-structure and function-mutation relationships of p53 tumor suppressor protein by high-resolution missense mutation analysis. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2003; 100:8424-9.

Kebebew E, Reiff E, Duh QY, Clark OH, McMillan A. Extent of disease at presentation and outcome for adrenocortical carcinoma: have we made progress? **World J Surg** 2006; 30:872-8.

Kendrick ML, Lloyd R, Erickson L, et al. Adrenocortical carcinoma: surgical progress or status quo? **Arch Surg** 2001; 136:543-9.

Kerkhofs TM, Verhoeven RH, Van der Zwan JM, et al. Adrenocortical carcinoma: a population-based study on incidence and survival in the Netherlands since 1993. **Eur J Cancer** 2013; 49:2579-86.

Kerkhofs TM, Ettaieb MH, Hermsen IG, Haak HR. Developing treatment for adrenocortical carcinoma. **Endocr Relat Cancer** 2015; 22:R325-38.

Kim AC, Reuter AL, Zubair M, et al. Targeted disruption of beta-catenin in Sf1-expressing cells impairs development and maintenance of the adrenal cortex. **Development** 2008; 135:2593-602.

Klein JD, Turner CG, Gray FL, et al. Adrenal cortical tumors in children: factors associated with poor outcome. **J Pediatr Surg** 2011; 46:1201-7.

Kuper H, Boffetta P, Adami HO. Tobacco use and cancer causation: association by tumour type. **J Intern Med** 2002; 252:206-24.

Lane DP. Cancer: p53, guardian of the genome. **Nature** 1992; 358:15-6.

Larsen SJ, do Canto LM, Rogatto SR, Baumbach J. CoNVaQ: a web tool for copy number variation-based association studies. **BMC Genomics** 2018; 19:369.

Latronico AC, Chrousos GP. Extensive personal experience: adrenocortical tumors. **J Clin Endocrinol Metab** 1997; 82:1317-24.

Latronico AC, Pinto EM, Domenice S, et al. An inherited mutation outside the highly conserved DNA-binding domain of the p53 tumor suppressor protein in children and adults with sporadic adrenocortical tumors. **J Clin Endocrinol Metab** 2001; 86:4970-3.

Lefevre M, Gerard-Marchant R, Gubler JP, Chaussain JL, Lemerle J. Adrenal cortical carcinoma in 42 patients treated from 1958 to 1980 at Villejuif. In: Humphrey GB, Grindey GB, Dehner LB, et al. editors. **Adrenal and endocrine tumors in children**. Boston: Martinus Nijhoff Publishers; 1984. p.256-76.

Letouzé E, Rosati R, Komechen H, SNP array profiling of childhood adrenocortical tumors reveals distinct pathways of tumorigenesis and highlights candidate driver genes. **J Clin Endocrinol Metab** 2012; 97:E1284-93.

Li B, Taiwen L, Pignon JC et al. Landscape of tumor-infiltrating T cell repertoire of human cancers. **Nat Genet** 2016; 48:725-32.

Li FP, Fraumeni JF Jr. Rhabdomyosarcoma in children: epidemiologic study and identification of a familial cancer syndrome. **J Natl Cancer Inst** 1969a; 43:1365-73

Li FP, Fraumeni JF Jr. Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms. A familial syndrome? **Ann Intern Med** 1969b; 71:747-52.

Li FP, Fraumeni JF Jr, Mulvihill JJ, et al. A cancer family syndrome in twenty-four kindreds. **Cancer Res** 1988; 48:5358-62.

Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. **Bioinformatics** 2009; 25:1754-60.

Libé R. Adrenocortical carcinoma (ACC): diagnosis, prognosis, and treatment. **Front Cell Dev Biol** 2015; 3: 45.

Lirov R, Tobias E, Lerario AM, Hammer GD. Adrenal tumors In: DeVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA, editors. **DeVita, Hellman, and Rosenberg's cancer: principles and practice of oncology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2015. p.1195-204.

Lisik-Habib M, Czernek U, Dębska-Szmich S, et al. Secondary cancer in a survivor of hodgkin's lymphoma: a case report and review of the literature. **Oncol Lett** 2015, 9:964-6.

Luton JP, Cerdas S, Billaud L, et al. Clinical features of adrenocortical carcinoma, prognostic factors, and the effect of mitotane therapy. **N Engl J Med** 1990; 322:1195-201.

McKenna A, Hanna M, Banks E, et al. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. **Genome Res** 2010; 20:1297-303.

Mai PL, Best AF, Peters JA, et al. Risks of first and subsequent cancers among TP53 mutation carriers in the National Cancer Institute Li-Fraumeni syndrome cohort. **Cancer** 2016; 23:3673-81.

Malkin D, Li FP, Strong LC, et al. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. **Science** 1990; 250:1233-8.

Mansmann G, Lau J, Balk E, Rothberg M, Miyachi Y, Bornstein SR. The clinically inapparent adrenal mass: update in diagnosis and management. **Endocr Rev** 2004; 25:309-40.

Mastellaro MJ, Ribeiro RC, Oliveira-Filho AG, Seidinger AL, Cardinalli IA, Miranda ECM, Aguiar SS, Brandalise SR, Yunes JA, Barros-Filho AA. Adrenocortical tumors associated with the TP53 p.R337H germline mutation can be identified during child-care consultations. **J Pediatr** 2018;94:432-439.

McAteer JP, Huaco JA, Gow KW. Predictors of survival in pediatric adrenocortical carcinoma: a Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) program study. **J Pediatr Surg** 2013; 48:1025-31.

Mermejo LM, Leal LF, Colli LM, et al. Altered expression of noncanonical Wnt pathway genes in paediatric and adult adrenocortical tumours. **Clin Endocrinol (Oxford)** 2014; 81:503-10.

Michalkiewicz E, Sandrini R, Figueiredo B, et al. Clinical and outcome characteristics of children with adrenocortical tumors: a report from the International Pediatric Adrenocortical Tumor Registry. **J Clin Oncol** 2004; 5:838-45.

Mussa A, Ferrero GB, Ceoloni B, et al. Neonatal hepatoblastoma in a newborn with severe phenotype of Beckwith-Wiedemann syndrome. **Eur J Pediatrics** 2011; 170:1407-11.

Narzisi G, O'Rawe JA, Iossifov I, et al. Accurate de novo and transmitted indel detection in exome-capture data using microassembly. **Nat Methods** 2014; 11:1033-6.

Nichols KE, Malkin D, Garber JE, Fraumeni JF Jr, Li FP. Germ-line p53 mutations predispose to a wide spectrum of early-onset cancers. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2001; 2:83-7.

O'Keefe C, McDevitt MA, Maciejewski JP. Copy neutral loss of heterozygosity: a novel chromosomal lesion in myeloid malignancies. **Blood** 2010; 115:2731-9

Olivier M, Goldgar DE, Sodha N, et al. Li-Fraumeni and related syndromes: correlation between tumor type, family structure, and TP53 genotype. **Cancer Res** 2003; 63:6643-50.

Palmero EI, Schuler-Faccini L, Caleffi M. Detection of R337H a germline TP53 mutation predisposing to multiple cancers in asymptomatic women participating in a breast cancer screening program in Southern Brazil. **Cancer Lett** 2008; 261:21-5.

Paton BL, Novitsky YW, Zerey M, et al. Outcomes of adrenal cortical carcinoma in the United States. **Surgery** 2006; 140:914-20.

PDQ® Adult Treatment Editorial Board. PDQ Adrenocortical Carcinoma Treatment. Bethesda, MD: National Cancer Institute. Updated <MM/DD/YYYY>. Available at: <https://www.cancer.gov/types/adrenocortical/hp/adrenocortical-treatment-pdq>. Accessed <08/23/2018>

Petitjean A, Achatz MI, Borresen-Dale AL, Hainaut P, Olivier M. TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. **Oncogene** 2007; 26:2157-65.

Pianovski MA, Maluf EM, de Carvalho DS, et al. Mortality rate of adrenocortical tumors in children under 15 years of age in Curitiba, Brazil. **Pediatr Blood Cancer** 2006; 47:56-60.

Pinto EM, Billerbeck AE, Villares MC, et al. Founder effect for the highly prevalent R337H mutation of tumor suppressor p53 in Brazilian patients with adrenocortical tumors. **Arq Bras Endocrinol Metabol** 2004; 48:647-50.

Pinto EM, Chen X, Easton J, et al. Genomic landscape of paediatric adrenocortical tumours. **Nat Commun** 2015; 6:6302.

Potter SL, Venkatramani R, Wenderfer S, et al. Renal cell carcinoma harboring somatic TSC2 mutations in a child with methylmalonic acidemia. **Pediatr Blood Cancer** 2017; 64:e26286.

Rainier S, Johnson LA, Dobry CJ, Ping AJ, Grundy PE, Feinberg AP. Relaxation of imprinted genes in human cancer. **Nature** 1993; 362:747-9.

Rana HQ, Gelman R, LaDuca H, et al. Differences in TP53 mutation carrier phenotypes emerge from panel-based testing. **J Natl Cancer Inst** 2018 Feb 26; [Epub ahead of print].

Reither EN, Hauser RM, Yang Y. Do birth cohorts matter? Age-period-cohort analyses of the obesity epidemic in the United States. **Soc Sci Med** 2009; 69:1439-48.

Renaux-Petel M, Charbonnier F, Théry JC, et al. Contribution of de novo and mosaic TP53 mutations to Li-Fraumeni syndrome. **J Med Genet** 2018; 55:173-80.

Ribeiro RC, Sandrini F, Figueiredo B, et al. An inherited p53 mutation that contributes in a tissue-specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2001; 98:9330-5.

Ribeiro RC, Pinto EM, Zambetti GP, Rodriguez-Galindo C. The International Pediatric Adrenocortical Tumor Registry initiative: contributions to clinical, biological, and treatment advances in pediatric adrenocortical tumors. **Mol Cell Endocrinol** 2012; 1:37-43.

Rosenberg PS, Check DP, Anderson WF. A Web Tool for age-period-cohort analysis of cancer incidence and mortality rates. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2014; 23:2296-302.

Ronchi CL, Sbiera S, Leich E, et al. Single nucleotide polymorphism array profiling of adrenocortical tumors-evidence for an adenoma carcinoma sequence? **PLoS One** 2013, 9:e73959.

Rubin B, Monticelli H, Redaelli M, et al. Mitogen-activated protein kinase pathway: genetic analysis of 95 adrenocortical tumors. **Cancer Invest** 2015; 33:526-31.

Ruijs MW, Broeks A, Menko FH, et al. The contribution of CHEK2 to the TP53-negative Li-Fraumeni phenotype. **Hered Cancer Clin Pract** 2009; 7:4.

Ruijs MW, Verhoef S, Rookus MA, et al. TP53 germline mutation testing in 180 families suspected of Li-Fraumeni Syndrome: mutation detection rate and relative frequency of cancers in different familial phenotypes. **J Med Genet** 2010; 47:421-8.

Russell AJ, Sibbald J, Haak H, Keith WN, McNicol AM. Increasing genome instability in adrenocortical carcinoma progression with involvement of chromosomes 3, 9 and X at the adenoma stage. **Br J Cancer** 1999, 4:684-9.

Sabaretnam M, Mishra A, Agarwal G, Agarwal A, Verma AK, Mishra SK. Adrenocortical carcinoma in children and adults: Two decades experience in a single institution. **Indian J Cancer** 2016; 53:317-21.

Sambrook J, Russell DW. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor; 2001. Gel eletroforese; p.5.36-9.

Sandrini R, Ribeiro RC, DeLacerda L. Childhood adrenocortical tumors. **J Clin Endocrinol Metab** 1997; 82:2027-31.

Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. **J Mol Biol** 1975; 94:441-8.

Saunders CT, Wong WS, Swamy S, Becq J, Murray LJ, Cheetham RK. Strelka: accurate somatic small-variant calling from sequenced tumor-normal sample pairs. **Bioinformatics** 2012; 28:1811-7.

Schneider DF, Mazeh H, Lubner SJ, Jaume JC, Chen H. Cancer of the endocrine system. In: Neiderhuber JE, Armitage JO, Doroshow JH, Kastan MB, Tepper JE, editors. **Abeloff's clinical oncology**. Philadelphia: Elsevier; 2014. p.1112-42.

Schrader J, Henes FO, Perez D, et al. Successful mTOR inhibitor therapy for a metastatic neuroendocrine tumour in a patient with a germline TSC2 mutation. **Ann Oncol** 2017; 28:904-5.

Scollo C, Russo M, Trovato MA, et al. Prognostic factors for adrenocortical carcinoma outcomes. **Front Endocrinol (Lausanne)** 2016; 7:99.

Seidinger AL, Mastellaro MJ, Paschoal Fortes F, et al. Association of the highly prevalent TP53 R337H mutation with pediatric choroid plexus carcinoma and osteosarcoma in southeast Brazil. **Cancer** 2011; 117:2228-35.

Seidinger AL, Fortes FP, Mastellaro MJ, et al. Occurrence of neuroblastoma among TP53 p.R337H Carriers. **PLoS One** 2015; 10:e0140356.

Sharma E, Dahal S, Sharma P, et al. The characteristics and trends in adrenocortical carcinoma: a United States population based study. **J Clin Med Res** 2018; 10:636-40.

Simon DP, Hammer GD. Adrenocortical stem and progenitor cells: implications for adrenocortical carcinoma. **Mol Cell Endocrinol** 2012; 351:2-11.

Stiller CA. International variations in the incidence of childhood carcinomas. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 1994; 3:305-10.

Tella SH, Kommalapati A, Yaturu S, Kebebew E. Predictors of survival in adrenocortical carcinoma: an analysis from the National Cancer Database (NCDB). **J Clin Endocrinol Metab** 2018 Jun 21; [Epub ahead of print]

Tinat J, Bougeard G, Baert-Desurmont S, et al. 2009 version of the chompret criteria for Li Fraumeni syndrome. **J Clin Oncol** 2009; 27:e108-9.

Valdez JM, Nichols KE, Kesserwan C. Li-Fraumeni syndrome: a paradigm for the understanding of hereditary cancer predisposition. **Br J Haematol** 2017; 4:539-52.

Valentijn LJ, Pauchard MS, Brugières L, Landais P, Chaussain JL, Bougnères PF. Functional MYCN signature predicts outcome of neuroblastoma irrespective of MYCN amplification. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2012; 47:19190-5.

Varley JM, McGown G, Thorncroft M, et al. Germ-line mutations of TP53 in Li-Fraumeni families: an extended study of 39 families. **Cancer Res** 1997; 57:3245-52.

Varley JM, McGown G, Thorncroft M, et al. Are there low-penetrance TP53 Alleles? Evidence from childhood adrenocortical tumors. **Am J Hum Genet** 1999; 65:995-1006.

Vatrano S, Volante M, Duregon E, et al. SNP array profiling of childhood adrenocortical tumors reveals distinct pathways of tumorigenesis and highlights candidate driver genes. **J Clin Endocrinol Metab** 2012; 97:E1284-93.

Vogt A, Schmid S, Heinimann K, et al. Multiple primary tumours: challenges and approaches, a review. **ESMO Open** 2017; 2:e000172.

Wasserman JD, Zambetti GP, Malkin D. Towards an understanding of the role of p53 in adrenocortical carcinogenesis. **Mol Cell Endocrinol** 2012; 351:101-10.

Wasserman JD, Novokmet A, Eichler-Jonsson C, et al. Prevalence and functional consequence of TP53 mutations in pediatric adrenocortical carcinoma: a children's oncology group study. **J Clin Oncol** 2015; 6:602-9.

Weinstein LS, Shenker A, Gejman PV, et al. Activating mutations of the stimulatory G protein in the McCune-Albright syndrome. **N Engl J Med** 1991, 325:1688-95.

Weir HK, Johnson CJ, Thompson TD. The effect of multiple primary rules on population-based cancer survival. **Cancer Causes Control** 2013; 24:1231-42.

West AN, Neale GA, Pounds S, et al. Gene expression profiling of childhood adrenocortical tumors. **Cancer Res** 2007; 67:600-8.

Wilm A, Aw PP, Bertrand D, et al. LoFreq: a sequence-quality aware, ultra-sensitive variant caller for uncovering cell-population heterogeneity from high-throughput sequencing datasets. **Nucl Acids Res** 2012; 40:11189-201.

Wong P, Verselis SJ, Garber JE, et al. Prevalence of early onset colorectal cancer in 397 patients with classic Li-Fraumeni syndrome. **Gastroenterology** 2006; 130:73-9.

Wood ME, Vogel V, Ng A, et al. Second malignant neoplasms: assessment and strategies for risk reduction. **J Clin Oncol** 2012; 30:3734-45.

Wooten MD, King DK. Adrenal cortical carcinoma: epidemiology and treatment with mitotane and a review of the literature. **Cancer** 1993; 72:3145-55.

Yang Y. Trends in U.S. adult chronic disease mortality, 1960-1999: age, period, and cohort variations. **Demography** 2008; 45:387-416.

Ye K, Schulz MH, Long Q, Apweiler R, Ning Z. Pindel: a pattern growth approach to detect break points of large deletions and medium sized insertions from paired-end short reads. **Bioinformatics** 2009; 25:2865-71.

Young JL Jr, Ries LG, Silverberg E, Horm JW, Miller RW. Cancer incidence, survival, and mortality for children younger than age 15 years. **Cancer** 1986; 58:598-602.

Zancanella P, Pianovski MA, Oliveira BH, et al. Mitotane associated with cisplatin, etoposide, and doxorubicin in advanced childhood adrenocortical carcinoma: mitotane monitoring and tumor regression. **J Pediatr Hematol Oncol** 2006; 28:513-24.

Zhang P, Lehmann BD, Shyr Y, Guo Y, The utilization of formalin fixed-paraffin-embedded specimens in high throughput genomic studies. **Int J Genomics** 2017; 2017:1926304.

Zheng S, Cherniack AD, Dewal N, et al. Comprehensive pan-genomic characterization of adrenocortical carcinoma. **Cancer Cell** 2016; 9:723-36.

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



**A.C. Camargo
Cancer Center**

**Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP**

São Paulo, 23 de junho de 2014.

A

Dra. Maria Isabel Waddington Achatz.

Aluna: Fernanda Paschoal Fortes (Doutorado).

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1903/14

“Identificação de genes de predisposição à carcinomas adrenocorticais e avaliação de perfis globais de expressão e alterações genômicas em pacientes portadores da Síndrome de Li-Fraumeni”.

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 10/06/2014, aprovaram a realização do projeto (datado de 2014) 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 o 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 AC Camargo Cancer Center;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Biobanco;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Laboratório de NeoGene (CIPE);
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Oncogenética;
- Declaração de Infraestrutura e Instalações do Departamento de Oncogenética;
- Orçamento Financeiro Detalhado.

Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas ao CEP dentro de 06 meses em relatório (modelo CEP).

Atenciosamente,


Dr. Jefferson Luiz Gross

1º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

1/1

Apêndice 1 - Descrição das alterações identificadas em todos os casos positivos para a mutação TP53 p.R337H

Chr	Inicio	Fim	Evento	P-Value	Pos: Ganho	Pos: Perda	Pos: cnLOH	Neg: Ganho	Neg: Perda	Neg: cnLOH	ADR 7	ADR 14	ADR 17	ADR 23	ADR-35	ADR 36	ADR 37
1	121335715	149722200	Ganho	0,028	100%	0%	33%	0%	0%	50%	cnLOH, Ganho	Ganho	Ganho			cnLOH	cnLOH
1	179562142	183934679	Ganho	0,028	100%	0%	33%	0%	0%	75%	cnLOH, Ganho	Ganho	Ganho		cnLOH	cnLOH	cnLOH
1	229888219	235661510	Ganho	0,028	100%	0%	33%	0%	0%	75%	cnLOH, Ganho	Ganho	Ganho		cnLOH	cnLOH	cnLOH
1	176088267	177360373	Ganho	0,028	100%	0%	33%	0%	0%	50%	cnLOH, Ganho	Ganho	Ganho			cnLOH	cnLOH
1	178799440	179562142	Ganho	0,028	100%	0%	33%	0%	0%	50%	cnLOH, Ganho	Ganho	Ganho			cnLOH	cnLOH
1	95020946	95262854	Ganho	0,028	100%	0%	33%	0%	0%	50%	cnLOH, Ganho	Ganho	Ganho			cnLOH	cnLOH
1	152612910	152761909	Ganho	0,028	100%	0%	33%	0%	0%	50%	cnLOH, Ganho	Ganho	Ganho			cnLOH	cnLOH
1	156715644	156722936	Ganho	0,028	100%	0%	33%	0%	0%	50%	cnLOH, Ganho	Ganho	Ganho			cnLOH	cnLOH
1	159387974	159392191	Ganho	0,028	100%	0%	33%	0%	0%	50%	cnLOH, Ganho	Ganho	Ganho			cnLOH	cnLOH
1	170408391	170411944	Ganho	0,028	100%	0%	33%	0%	0%	50%	cnLOH, Ganho	Ganho	Ganho			cnLOH	cnLOH
1	174057159	174061337	Ganho	0,028	100%	0%	33%	0%	0%	50%	cnLOH, Ganho	Ganho	Ganho			cnLOH	cnLOH
1	161990164	161990270	Ganho	0,028	100%	0%	33%	0%	0%	50%	cnLOH, Ganho	Ganho	Ganho			cnLOH	cnLOH
7	66069154	66323116	Ganho	0,028	0%	0%	67%	100%	0%	0%		cnLOH	cnLOH	Ganho	Ganho	Ganho	Ganho
17	34071799	39371904	Perda	0,028	0%	100%	0%	0%	0%	100%	Perda	Perda	Perda	cnLOH	cnLOH	cnLOH	cnLOH

17	39535065	42761941	Perda	0,028	0%	100%	0%	0%	0%	100%	Perda	Perda	Perda	cnLOH	cnLOH	cnLOH	cnLOH
17	39371904	39535065	Perda	0,028	0%	100%	0%	25%	0%	100%	Perda	Perda	Perda	cnLOH, Ganho	cnLOH	cnLOH	cnLOH
17	34071799	39371904	cnLO H	0,028	0%	100%	0%	0%	0%	100%	Perda	Perda	Perda	cnLOH	cnLOH	cnLOH	cnLOH
17	39535065	42761941	cnLO H	0,028	0%	100%	0%	0%	0%	100%	Perda	Perda	Perda	cnLOH	cnLOH	cnLOH	cnLOH
17	33950977	34071799	cnLO H	0,0285	0%	67%	0%	0%	0%	100%	Perda		Perda	cnLOH	cnLOH	cnLOH	cnLOH
17	39371904	39535065	cnLO H	0,0283	0%	100%	0%	25%	0%	100%	Perda	Perda	Perda	cnLOH, Ganho	cnLOH	cnLOH	cnLOH
17	42761941	43051391	cnLO H	0,028	0%	67%	0%	0%	0%	100%	Perda		Perda	cnLOH	cnLOH	cnLOH	cnLOH
