

**AVALIAÇÃO DAS MUTAÇÕES NOS CÓDONS 41 E 45 DO  
GENE CODIFICANTE DA BETACATENINA EM  
PACIENTES PORTADORES DE TUMOR DESMOIDE  
ESPORÁDICO E SUA ASSOCIAÇÃO COM O  
PROGNÓSTICO**

**FÁBIO FERNANDO ELÓI PINTO**

**Tese apresentada à Fundação Antônio  
Prudente para obtenção do título de  
Doutor em Ciências  
Área de concentração: Oncologia**

**Orientador: Prof. Dr. Ademar Lopes**

**Coorientadores:**

**Dra. Dirce Maria Carraro**

**Dra. Isabela Werneck da Cunha**

**Dr. Celso Abdon Lopes de Mello**

**São Paulo**

**2019**

**FICHA CATALOGRÁFICA**  
**Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente**

Elói Pinto, Fábio Fernando

**Avaliação das mutações nos códons 41 e 45 do gene codificante da Betacatenina em pacientes portadores de tumor desmoide esporádico e sua associação com o prognóstico** / Fábio Fernando Elói Pinto - São Paulo, 2019.

111p.

Tese (Doutorado) - Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: Ademar Lopes

Descritores: 1. Fibromatose Agressiva/Fibromatosis, Aggressive. 2. Tumor Desmoide/Desmoide Tumor. 3. Prognóstico/Prognosis. 4. Mutação em *CTNNB1/CTNNB1* Mutation. 5. Betacatenina/Beta-catenin.

*“É sempre melhor o impreciso que  
embala do que o certo que basta,  
Porque o que basta acaba onde  
basta e onde acaba não basta,  
E nada que se pareça com isto  
devia ser o sentido da vida...”*

**Álvaro de Campos,**  
em *A Casa Branca Nau Preta*

## DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, irmão, esposa e filhos,  
por todo amor, carinho, dedicação,  
paciência e apoio incondicional.*

*Aos meus professores, que sempre me orientaram e  
me guiaram nesta árdua, porém gratificante, jornada  
médico-acadêmica.*

*A todos os meus pacientes,  
pessoas que muito me ensinaram e com  
quem dividi angústias, alegrias, perdas e  
vitórias.*

## AGRADECIMENTOS

*Este estudo foi realizado com a ajuda de muitos colegas, amigos, familiares, professores e entusiastas da pesquisa e da ciência. Sendo assim, gostaria de agradecer imensamente a todos que fizeram parte da minha formação e que, indiretamente, contribuíram para a concretização deste trabalho, bem como àqueles que colaboraram diretamente nas diversas etapas deste estudo.*

*Ao meu orientador, Prof. Dr. Ademar Lopes, vice-presidente da Fundação Antônio Prudente, por seu exemplo de dedicação à ciência e pelo importante papel em minha formação na área de cirurgia oncológica, pela confiança ao me aceitar como seu aluno de pós-graduação e por todo apoio e orientação.*

*À minha coorientadora e pesquisadora responsável pelo Laboratório de Genômica e Biologia Molecular do Centro Internacional de Pesquisa (CIPE) do A.C. Camargo Cancer Center, Dra. Dirce Maria Carraro, por seu fundamental papel na viabilização das análises moleculares realizadas neste estudo, bem como por sua disponibilidade, além de críticas, ponderações e sugestões no delineamento deste projeto.*

*À minha coorientadora e ex-titular do Departamento de Anatomia Patológica do A.C. Camargo Cancer Center e, hoje, médica patologista da Rede D'OR São Luiz em São Paulo, Dra. Isabela Werneck Cunha, por sua importante contribuição no esboço deste estudo, na revisão de todas as lâminas e em seus respectivos diagnósticos histológicos.*

*Ao meu coorientador e médico titular do Departamento de Oncologia Clínica do A.C. Camargo Cancer Center, Dr. Celso Abdon Lopes de Mello, por sua paciência, comentários, críticas e pragmatismo. Sua valiosa ajuda foi indispensável para o término deste manuscrito.*

*Ao estatístico do Núcleo de Epidemiologia e Estatística do CIPE, Dr. Vinicius Fernando Calsavara, pela amizade, paciência, orientações e sua meticulosa e imprescindível colaboração na análise estatística deste trabalho.*

*À Dra. Bruna Durães de Figueiredo Barros e à equipe do Laboratório de Genômica e Biologia Molecular do CIPE, por toda ajuda e execução do sequenciamento de segunda geração.*

*Às enfermeiras de pesquisa, Cássia da Silva e Thaís Safranov, pela amizade, disponibilidade e inestimável suporte na compilação do banco de dados sobre tumores desmoides, resgate das lâminas, blocos de anatomia patológica e organização de todo esse material.*

*À biomédica e supervisora de Pesquisa do Laboratório de Macromoléculas/Biobanco do A.C.Camargo Cancer Center, Eloisa Helena Ribeiro Olivieri, por sua presteza, disponibilidade e fundamental papel na extração das amostras de DNA para a realização das análises moleculares.*

*Ao médico titular do Departamento de Anatomia Patológica do A.C.Camargo Cancer Center, Dr. Felipe D'Almeida Costa, pela amizade e dedicação ao preparo das fotomicrografias.*

*À senhora Suely Francisco, da seção de ensino e apoio ao aluno do A.C.Camargo Cancer Center, pela revisão das referências bibliográficas e formatação desta tese.*

*Às senhoras Ana Maria Kurinari e Mônica Galati, pela revisão ortográfica e editoração da tese.*

*À senhora Christiane Gheler, por ter realizado as traduções para a língua inglesa.*

*Ao Setor de Pós-Graduação da Fundação Antônio Prudente, em especial, ao diretor do Departamento de Imagem do A.C.Camargo Cancer Center e coordenador do Programa de Pós-Graduação da Fundação Antônio Prudente, Dr. Rubens Chojniak; à supervisora de ensino da Fundação Antônio Prudente, senhora Luciana Cícero Reche Dias; às funcionárias, Luciana Costa Pitombeira, Karla Cristina Brito de Barros e Cássia Regina Dias Ramos, pela paciência e disposição em ajudar e orientar.*

*À pesquisadora do Laboratório de Genômica e Biologia Molecular do CIPE, Dra. Giovana Tardin Torrezan, pelas sugestões, correções e orientações realizadas na defesa de mudança de nível mestrado – doutorado.*

*Ao médico titular do Núcleo de Tumores Colorretais, Dr. Ranyell M. Spencer, pela amizade, conselhos, incentivo, sugestões e correções realizadas na defesa de mudança de nível mestrado – doutorado e na ocasião da qualificação deste trabalho.*

*À médica titular e chefe do Núcleo de Ortopedia do A.C.Camargo Cancer Center, Dra. Suely Akiko Nakagawa, por sua amizade, confiança, bem como pela oportunidade dada a mim de participar desse núcleo, tendo seu apoio e incentivo para a realização deste projeto.*

*Ao médico titular do Núcleo de Ortopedia do A.C.Camargo Cancer Center e chefe do serviço de Ortopedia do Hospital do Servidor Público Municipal, Dr. Wu Tu Chung, pelo companheirismo, prestatividade e confiança em meu trabalho.*

*Ao fundador da Disciplina de Ortopedia e Traumatologia do Departamento de Cirurgia e Ortopedia da Faculdade de Medicina de Botucatu, da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Prof. Dr. Hamilton da*

*Rosa Pereira, pelo exemplo de dedicação ao ensino e por sempre ter sido um grande mestre, tutor, marco e pilar em minha formação intelectual e acadêmica, um grande incentivador e, acima de tudo, um amigo.*

*Ao exemplar professor da Disciplina de Ortopedia e Traumatologia do Departamento de Cirurgia e Ortopedia da Faculdade de Medicina de Botucatu, da UNESP, Prof. Dr. Gilberto José Cação Pereira, por todos os ensinamentos na área de ortopedia geral, traumatologia, cirurgia do quadril e por ter me incentivado a seguir na carreira acadêmica.*

*Ao professor titular do Instituto de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP), Prof. Dr. Olavo Pires de Camargo, exemplo de dedicação à pesquisa e ao ensino, por ter me acolhido e pela sólida formação em oncologia ortopédica que me proporcionou, pela confiança e incentivo em desbravar este vasto e árduo caminho da oncologia ortopédica e da ciência médica.*

*Ao chefe da Disciplina de Ortopedia e Traumatologia do Departamento de Cirurgia e Ortopedia da Faculdade de Medicina de Botucatu, da UNESP, Prof. Dr. Emílio Carlos Curcelli, por ter me incentivado na carreira de oncologista ortopédico, por acreditar e confiar a mim o serviço de tumores musculoesqueléticos da Disciplina de Ortopedia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (HC-FMB), da Unesp.*

*Ao exemplar cirurgião e chefe do Serviço de Oncologia Ortopédica do Hospital Beneficência Portuguesa de São Paulo e colega de trabalho no HC-FMB/UNESP, Prof. Dr. Valter Penna, pelos ensinamentos cirúrgicos, pela companhia nas longas cirurgias e por dividir comigo toda sua experiência na oncologia ortopédica.*

*Aos colegas Dr. André Mathias Batista, Dr. Marcelo Tadeu Caieiro, Dr. Daniel Reboledo e Dr. Luiz Felipe Corrêa, do Instituto de Ortopedia e*

*Traumatologia da Faculdade de Medicina, da USP, pelo primeiro contato que me proporcionaram com a especialidade de Oncologia Ortopédica, bem como pela amizade e parceria.*

*Aos companheiros e amigos do Núcleo de Sarcomas do Departamento de Cirurgia Pélvica do A.C.Camargo Cancer Center, Dra. Juliane Comunello, Dr. Samuel Aguiar Júnior, Dr. Wilson Toshihiko Nakagawa, Dr. Paulo Roberto Stevanato Filho, Dra. Renata Mayumi Takahashi, Dr. Tiago Santoro Bezerra, pela amizade, ajuda e suporte.*

*Aos professores, companheiros e amigos da Disciplina de Ortopedia e Traumatologia do Departamento de Cirurgia e Ortopedia da Faculdade de Medicina de Botucatu, da UNESP, Dr. Trajano Sardenberg, Dr. Paulo Roberto de Almeida Silveiras, Dr. Mauro dos Santos Volpi, Dr. Alfredo Alcântara Barreto, Dr. Reinaldo dos Santos Volpi, Dr. Sérgio Muller, Dr. Daniel Dinhane, Dr. Ricardo Violante, Dr. David Gumieiro, Dr. Denis Varanda, Dr. José Luiz Villas Boas Novelli, Dr. Mauricio Aguiar Foloni, Dr. Márcio Viveiros, Dr. Felipe Kazan, pela ajuda, por todo incentivo e pelos anos em que dividimos conhecimentos acerca dessa importante especialidade médica.*

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

*Aos meus pais, Marilda e Célio, e ao meu irmão, Daniel, pelo amor, dedicação, cuidados e orientações. Seria impossível percorrer essa longa e tortuosa trilha, tampouco seria possível conquistar o que tenho hoje, sem a ajuda de vocês.*

*À minha amiga, namorada, esposa, mãe dos meus três filhos e, acima de tudo, minha companheira, Thaís, por seu amor, carinho, incentivo, paciência – muita paciência – e pelo incondicional apoio demonstrado tanto nos momentos de alegria e “águas calmas” quanto nos momentos difíceis.*

*Aos meus filhos, amores e motivação da minha vida, Arthur, Raquel e Felipe, pessoas que em tão tenra idade me auxiliaram a repensar minhas atitudes e, simplesmente, mudaram meus objetivos e minha visão de mundo.*

*Aos meus sogros, João e Albinha, por me acolherem em seu lar e sua família e, muitas vezes, por ocuparem meu lugar de marido e pai, quando a profissão, o ensino ou a pesquisa me ausentaram do núcleo familiar.*

*Ao médico ortopedista, amigo desde o início do curso de medicina, companheiro de residência médica e profissão, irmão que a vida me proporcionou, Dr. Rodrigo Vannini, por simplesmente estar ao meu lado me incentivando e ajudando em muitos momentos da minha vida.*

## RESUMO

Elói Pinto FF. **Avaliação das mutações nos códons 41 e 45 do gene codificante da *betacatenina* em pacientes portadores de tumor desmoide esporádico e sua associação com o prognóstico.** São Paulo; 2019. [Tese de Doutorado - Fundação Antônio Prudente]

O tumor desmoide (TD) é uma proliferação fibroblástica clonal rara, caracterizada por crescimento infiltrativo e tendência à recidiva local, embora incapaz de metastatizar. A maioria desses tumores é esporádica e contém mutações no gene que codifica a proteína betacatenina. Três mutações em dois códons do gene *CTNNB1* foram identificadas como mais frequentes. O tratamento cirúrgico dessa doença tem se mostrado um verdadeiro desafio, e a identificação de fatores prognósticos poderia ajudar na caracterização de grupos com maior ou menor risco para desenvolver recidiva local após esse tratamento. O objetivo deste estudo foi avaliar mutações nos códons 41 e 45 do gene *CTNNB1* em pacientes portadores de tumores desmoides esporádicos tratados com cirurgia, bem como avaliar a possível influência de variáveis clínicas, demográficas e moleculares na sobrevida livre de recidiva. **Materiais e Métodos:** Foi conduzido estudo retrospectivo, unicêntrico, transversal. Foram incluídos pacientes com diagnóstico de tumor desmoide submetidos à ressecção cirúrgica, que tinham dados clínicos e material biológico disponíveis. A correlação entre as variáveis qualitativas foi feita pelo teste qui-quadrado ou teste exato de Fisher; a comparação das variáveis quantitativas pelo teste U de Mann-Whitney ou pelo teste de Kruskal-Wallis; a análise de sobrevida livre de recidiva pela técnica de Kaplan-Meier; e os riscos relativos pela técnica de regressão de Cox uni ou multivariada. **Resultados:** No período de 1980 a 2015, foram identificados 107 pacientes. A maioria era do sexo feminino (58,9%), de etnia branca (78,9%), tinha idade entre 25 e 50 anos (58,9%), com lesões que se localizavam fora das extremidades (63,4%),

apresentando tamanho menor que 10 centímetros (76,4%) e todos foram tratados cirurgicamente. O tempo de seguimento médio foi de 134 meses, a taxa global de sobrevida livre de recidiva (SLR) foi de 74,5% em 2 anos, 65,1% em 5 anos, 63,7% em 10 anos e 59,5% em 20 anos. Dos 107 pacientes que possuíam informações clínicas, foram obtidas 71 amostras tumorais para análise molecular que foi realizada utilizando NGS. Destes, 61 pacientes (85,9%) apresentavam alguma mutação nos códons 41 ou 45 do éxon 3 do gene *CTNNB1* e 10 espécimes (14,1%) não tinham qualquer mutação nesses códons. Trinta e três (46,5%) pacientes apresentaram mutação T41A 16 (22,5%) S45F, 6 (8,5%) S45P, 5 (7%) T41A e S45F e 1 (1,4%) T41A e S45F, o valor médio da frequência alélica foi de 16,54%. Os pacientes com mutação S45F apresentaram taxa de sobrevida livre de recidiva em dois, cinco e dez anos menor do que os demais pacientes não mutados ou com outro tipo de mutação (26,7% 13,3% e 13,3% *versus* 78,4%, 68,1% e 65,4%, respectivamente). Na análise multivariada, tipo de mutação (RR = 5,25 IC [ 2,27–12,15];  $p < 0,0001$ ) e topografia (RR = 3,15 IC [1,35– 7,33];  $p = 0,008$ ) foram fatores independentes para o risco de recidiva e o modelo prognóstico proposto evidenciou que os pacientes com alto risco (um ou dois fatores) podem apresentar até 8,36 vezes mais risco de recidiva local após o tratamento cirúrgico que os demais pacientes (IC [2,87–24,6];  $p = 0,0001$ ). Os resultados do presente estudo permitem concluir que o sequenciamento de segunda geração é um método adequado para detectar as mutações nos pacientes com tumores desmoides, e a mutação S45F esteve associada com maior risco de recidiva local. Em conjunto com outros fatores clínicos, a presença dessa mutação pode identificar um subgrupo de pacientes com elevado risco de recidiva. Esse achado pode auxiliar na indicação de cirurgias extensas e mutilantes, evitando a morbidade para um grupo específico de pacientes. Todavia, tais achados devem ser validados em uma coorte mais ampla de pacientes.

**Descritores:** Fibromatose Agressiva. Tumor Desmoide. Prognóstico. Mutação em CTNNB1. Betacatenina

## SUMMARY

Elói Pinto FF. **[Evaluation of mutations in codons 41 and 45 of the Beta-Catenin encoding gene in patients with sporadic desmoid tumors and its association with prognosis]**. Sao Paulo; 2019. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente]

The desmoid tumor (DT) is a rare (mono)clonal fibroblastic proliferation characterized by infiltrative growth with tendency to local recurrence although unable to metastasize. Most of these tumors are sporadic and contain mutations in the gene encoding Beta-Catenin. Three mutations in two codons of the *CTNNB1* gene were identified as being more frequent. Surgical treatment of this disease has been revealed to be a real challenge and the identification of prognostic factors would help in the identification of groups with higher or lower risk to develop local recurrence after this treatment. The objective of this study was to evaluate mutations in codons 41 and 45 of the *CTNNB1* gene in patients whose tumors were treated with surgery as well as to assess clinical and demographic variables and correlate them with relapse-free survival. Materials and Methods: a retrospective, unicentric, cross-sectional study was conducted. Patients diagnosed with desmoid tumor who were submitted to surgery, had clinical data and biological material available were included. The correlation between the qualitative variables was made by the chi-square test or Fisher exact test; the quantitative variables comparison by the Mann-Whitney U test or Kruskal-Wallis test; the relapse-free survival by Kaplan-Meier; and relative risks by the univariate or multivariate Cox regression technique. Results: 107 patients were identified from 1980 to 2015. The majority were female (58.9%), white (78.9%) 25-50 years old (58.9%), their lesions were located outside the extremities (63.4%), measured less than 10 centimeters (76.4%) and they were all surgically treated. Mean follow up period was 134 months, overall relapse-free survival rate (RFS) was 74.5% in 2 years, 65.1% in 5

years, 63.7% in 10 years and 59.5% in 20 years. From 107 patients who had clinical information, 71 samples were obtained for molecular analysis. Among these, 61 patients (85.9%) had mutations at codons 41 or 45 of exon 3 of the *CTNNB1* gene and 10 specimens (14.1%) had no mutations at these codons. Thirty-three (46.5%) patients had mutation T41A 16 (22.5%) S45F, 6 (8,5%) S45P, 5 (7%) T41A and S45F and 1 (1,4%) T41A and S45F, the mean of allele frequency was 16.54%. Patients with mutation S45F had a relapse-free survival rate of two, five and 10 years smaller than the patients with no mutations or with a different mutation (26.7% 13.3% and 13.3% *versus* 78.4%, 68.1% and 65.4%, respectively). In the multivariate analysis, type of mutation (RR = 5,5 IC[2.27 – 12.15];  $p < 0.0001$ ) and topography (RR = 3.15 IC [1.35 – 7.33];  $p = 0.008$ ) correlated with risk of relapse and the proposed prognostic model demonstrated that high risk patients (one or two factors) may present a greater risk (up to 8.36 times) of local recurrence after surgical treatment than other patients (IC[2.87 – 24.6];  $p = 0.0001$ ). The results of the present study allow us to conclude that second generation sequencing is a suitable method to detect mutations in patients with desmoid tumors and the S45F mutation has been associated with an increased risk of local recurrence. Combined with other clinical factors, the presence of this mutation may identify a subgroup of patients with a high risk of relapse. This finding may support the indication of extensive and mutilating surgeries, avoiding morbidity for a specific group of patients. Nevertheless, such findings should be validated in a broader cohort of patients.

**Key-words:** Fibromatosis, Aggressive. Desmoide Tumor. Prognosis. CTNNB1 Mutation. Beta-catenin.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Localização de 169 casos de tumores desmoides-casuística A.C.Camargo Cancer Center 1980 – 2015 .....	3
<b>Figura 2</b>	Fotomicrografia evidenciando estudo histológico e imuno-histoquímico comparando tecido cicatricial e o tumor desmoide .	5
<b>Figura 3</b>	Via de sinalização Wnt: os principais reguladores desta via são encontrados na membrana plasmática e em vários complexos citoplasmáticos.....	14
<b>Figura 4</b>	Via de sinalização Wnt: Modelo para regulação transcricional de genes-alvo Wnt .....	15
<b>Figura 5</b>	Fluxograma da casuística .....	33
<b>Figura 6</b>	Curva atuarial de sobrevida livre de recidiva (SLR) para 102 pacientes portadores de tumor desmoide esporádico submetidos ao tratamento cirúrgico.....	51
<b>Figura 7</b>	Curva atuarial de sobrevida livre de recidiva para 102 pacientes portadores de tumor desmoide, de acordo com a variável idade (52 pacientes maiores do que o <i>cut-off</i> de 31 anos e 50 com idade igual ou menor que 31 anos .....	53
<b>Figura 8</b>	Estimativa do ponto de corte para a variável tamanho do tumor em relação à recidiva da doença .....	54

<b>Figura 9</b>	Curva atuarial de sobrevida livre de recidiva para 87 pacientes portadores de tumor desmoide, de acordo com o tamanho do tumor (71 pacientes com o tamanho menor ou igual ao <i>cut-off</i> de 10cm e 16 pacientes com tamanho maior que 10 cm).....	55
<b>Figura 10</b>	Curva atuarial de sobrevida livre de recidiva para 87 pacientes portadores de tumor desmoide de acordo com a variável tamanho do tumor “T”, conforme categorizada pelo estadiamento TNM (33 pacientes com tamanho menor que 5 centímetros; 34, entre 5 e 10 centímetros; e 20, maior ou igual a 10 centímetros)	56
<b>Figura 11</b>	Curva atuarial de sobrevida livre de recidiva para 102 pacientes portadores de tumor desmoide, de acordo com a localização (10 casos, no abdome não parede abdominal; 20 na parede abdominal; 15 na cabeça/pescoço; 19 na parede torácica/dorso; e 38, nas extremidades).....	57
<b>Figura 12</b>	Curva atuarial de sobrevida livre de recidiva para 102 pacientes portadores de tumor desmoide, de acordo com a variável topografia 2 (64 não extremidades e 38 localizados nas extremidades).....	58
<b>Figura 13</b>	Curva atuarial de sobrevivência para 97 pacientes portadores de tumor desmoide, de acordo com a variável número de cirurgias prévias à admissão (nenhuma cirurgia n = 65, uma cirurgia n = 24, duas cirurgias n = 6, três cirurgias n = 2).....	59
<b>Figura 14</b>	Curva atuarial de sobrevida livre de recidiva para 98 pacientes portadores de tumor desmoide, de acordo com o tipo de tratamento (85 pacientes submetidos apenas à cirurgia e 13 submetidos à cirurgia combinada com algum outro tratamento) .....	60

- Figura 15** Curva atuarial de sobrevida livre de recidiva para 93 pacientes, de acordo com as margens cirúrgicas (60 pacientes com margens livres e 33 com margens comprometidas) ..... 61
- Figura 16** Curva atuarial de sobrevida livre de recidiva para 66 pacientes de acordo com o *status* de mutação dos pacientes (10 pacientes sem mutação 29 com mutação T41A 15 com S45F, 6 com S45P, 5 com T41A e S45F e 1 com T41A e S45F) ..... 62
- Figura 17** Curva atuarial de sobrevida livre de recidiva para 66 pacientes de acordo com o tipo de mutação (15 com mutação S45F *versus* 51 com outras mutações ou não mutados)..... 63
- Figura 18** Curva atuarial de sobrevida livre de recidiva para 34 pacientes, de acordo com o *status* de mutação dos pacientes (4 sem mutação 17 com mutação T41A, 8 com mutação S45F 2 S45P 2 com T41A e S45F e 1 T41A) ..... 64
- Figura 19** Curva atuarial de sobrevida livre de recidiva para 34 pacientes de acordo com o *status* de mutação, apenas para pacientes com margens livres..... 65
- Figura 20** Curva de sobrevida livre de recidiva para 56 pacientes, de acordo com a variável frequência alélica (*cut-off*) ou fração de alelo variante (16 espécimes com menos de 10% e 40 espécimes com VAF igual ou maior que 10%) ..... 66
- Figura 21** Curva de sobrevida livre de recidiva estimada via Kaplan-Meier em relação à variável número de fatores de pior prognóstico ..... 75

**Figura 22** Curva de sobrevida estimada via Kaplan-Meier em relação à variável número de fatores de pior prognóstico ..... 77

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Frequência das variáveis clínicas e demográficas .....	34
<b>Tabela 2</b>	Frequência das variáveis de tratamento .....	38
<b>Tabela 3</b>	Situação clínica dos 107 pacientes portadores de tumores desmoides ao final da atualização dos dados .....	39
<b>Tabela 4</b>	Tabulação cruzada: margens (livres e comprometidas) x <i>status</i> de recidiva (não e sim) .....	40
<b>Tabela 5</b>	Caracterização das alterações moleculares e das mutações nos códons 41 e 45 do gene da betacatenina dos 71 casos estudados .....	42
<b>Tabela 6</b>	Distribuição das mutações por subgrupos categorizados .....	45
<b>Tabela 7</b>	Distribuição da frequência alélica por subgrupos categorizados .....	46
<b>Tabela 8</b>	Associação entre gênero, idade e localização com o tipo de mutação encontrado no sequenciamento dos códons 41 e 45 do gene <i>CTNNB1</i> .....	47
<b>Tabela 9</b>	Associação entre gênero, idade e localização com a frequência alélica categorizada em menor ou igual a 10%, entre 10 e 20% e maior que 20% .....	48

<b>Tabela 10</b>	Sobrevida livre de recidiva em 2, 5 10 e 20 anos com seu respectivo erro padrão.....	51
<b>Tabela 11</b>	Sobrevida livre de recidiva em até dois, cinco e dez anos, de acordo com as variáveis demográficas, clínicas e moleculares de pacientes portadores de tumor desmoide .....	67
<b>Tabela 12</b>	Estimativas dos parâmetros do modelo de regressão de Cox simples.....	70
<b>Tabela 13</b>	Estimativas dos parâmetros do modelo de regressão de Cox múltiplo.....	74
<b>Tabela 14</b>	Estimativas dos parâmetros do modelo de regressão de Cox simples.....	76
<b>Tabela 15</b>	Estimativas dos parâmetros do modelo de regressão de Cox múltiplo.....	76
<b>Tabela 16</b>	Estimativas dos parâmetros do modelo de regressão de Cox simples.....	77

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>ACS</b>	<i>American Cancer Society</i>
<b>AINES</b>	Anti-inflamatórios não esteroidais
<b>APC</b>	<i>Adenomatosis polyposis coli</i>
<b>ASCO</b>	<i>American Society of Clinical Oncology</i>
<b>BMI1</b>	<i>B cell-specific moloney murine leukemia virus integration site 1 gene</i>
<b>CAMs</b>	Moléculas de adesão celular
<b>CEP</b>	Comitê de Ética em Pesquisa
<b>CIPE</b>	Centro Internacional de Pesquisa
<b>CK1</b>	Caseína quinase 1
<b>COX2</b>	Cicloxigenase 2
<b>CTBP</b>	Proteína C-terminal
<b>CTNNB1</b>	Gene codificante da proteína betacatenina
<b>dbSNP</b>	Banco de dados de polimorfismo de base única
<b>DVL</b>	<i>Dishevelled</i>
<b>ePCR</b>	PCR em emulsão
<b>FA</b>	Frequência alélica
<b>FAP</b>	Polipose adenomatosa familiar
<b>GSK-3 Beta</b>	Glicogênio síntase-3 beta
<b>LDL</b>	lipoproteína de baixa densidade
<b>LEF</b>	Fator intensificador de linfócito
<b>LRP5</b>	Proteína 5 relacionada a receptor de lipoproteína
<b>LRP6</b>	Proteína 6 relacionada a receptor de lipoproteína
<b>MAF</b>	<i>Minor Allele Frequency</i>
<b>NGS</b>	Sequenciamento de próxima geração
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase
<b>PLG</b>	<i>Phase lock gel</i>
<b>QUIMIO</b>	Quimioterapia
<b>RADIO</b>	Radioterapia
<b>RNase</b>	Ribonuclease
<b>RR</b>	Risco relativo

<b>S45F</b>	Serina 45 fenilalanina
<b>S45P</b>	Serina 45 prolina
<b>SAME</b>	Serviço de Arquivo Médico Estatístico
<b>SLR</b>	Sobrevida livre de recaída ou recidiva
<b>T41A</b>	Treonina 41 alanina
<b>TCF</b>	Fator T-cell
<b>TNM</b>	Tamanho, linfonodo e metástase-estadiamento dos tumores
<b>UDG</b>	Uracila-dna glicosilase
<b>VAF</b>	Fração de alelo variante
<b>Wnt</b>	Fusão da inicial <i>W</i> do gene <i>wingless</i> com as iniciais <i>nt</i> do gene <i>integrated</i> ou <i>int-1</i> .

# ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1	Tumor desmoide.....	2
1.2	Diagnóstico.....	3
1.3	Etiologia.....	5
1.4	Tratamento .....	8
1.5	Via de sinalização Wnt/betacatenina.....	11
1.6	O gene da betacatenina ( <i>CTNNB1</i> ).....	15
1.7	O sequenciamento de próxima geração.....	17
1.8	Justificativa .....	19
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>21</b>
2.1	Objetivo Geral.....	21
2.2	Objetivos Específicos .....	21
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>22</b>
3.1	Comitê de Ética em Pesquisa.....	22
3.2	Casuística.....	22
3.3	Variáveis clínicas e demográficas .....	23
3.4	Extração do DNA.....	24
3.5	Sequenciamento do éxon 3 da betacatenina.....	25
3.6	Painel de 409 genes .....	27
3.7	Análise estatística.....	30
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>32</b>
4.1	Dados demográficos e clínicos.....	34
4.1.1	Gênero, idade e grupo étnico .....	34
4.1.2	Topografia e localização.....	35
4.1.3	Tamanho .....	35
4.1.4	Situação do paciente na admissão.....	36

4.1.5	Tratamento .....	36
4.2	Dados do seguimento.....	39
4.3	Dados sobre os pacientes recidivados .....	39
4.4	Caracterização molecular .....	41
4.5	Painel de 409 genes .....	49
4.6	Análise de sobrevida livre de recidiva local .....	50
4.7	Análise da sobrevida livre de recidiva de acordo com as variáveis moleculares .....	61
4.8	Modelos de regressão de Cox simples.....	69
4.9	Modelos de riscos proporcionais de Cox múltiplo.....	74
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>78</b>
5.1	Aspectos gerais .....	78
5.2	Aspectos demográficos e clínicos .....	79
5.3	Caracterização molecular .....	86
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>97</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>98</b>

## ANEXOS

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

**Anexo 2** Lista dos 409 genes do painel *Comprehensive Cancer Panel*

- *Thermo Fisher*

## APÊNDICES

**Apêndice 1** Ficha de avaliação clínica

**Apêndice 2** Lista dos pacientes não portadores de mutação nos  
códons 41 e 45 do gene *CTNNB1*

## 1 INTRODUÇÃO

Tecidos moles podem ser definidos como os tecidos extraesqueléticos não epiteliais do corpo. São representados pelos músculos, gordura, tecidos fibrosos e vasos sanguíneos. Por convenção, também estão incluídos nesse grupo os tumores do sistema nervoso periférico. Embriologicamente, os tecidos moles são derivados principalmente do mesoderma com alguma contribuição do neuroectoderma (ENZINGER e WEISS 2014a).

Os tumores de partes moles ou tumores de tecidos moles fazem parte de um grupo muito heterogêneo e são classificados pela linha de diferenciação, de acordo com o tecido adulto com o qual se parecem. Podem, também, ser benignos ou malignos, levando-se em consideração seu grau de diferenciação e seu potencial metastático. A incidência dos tumores de partes moles benignos é bem maior do que os malignos. Os sarcomas de tecidos moles quando comparados aos carcinomas são relativamente raros e correspondem a cerca de 1,0% de todos os cânceres com uma incidência anual de cerca de 1,8 a 5 casos por 100 mil pessoas (WIBMER et al. 2010). Para o ano de 2018, a *American Cancer Society* (ACS), equivalente à Sociedade Americana de Câncer, em português, estima 13.040 casos novos de sarcomas de partes moles e 5.150 mortes causadas por esse tipo de tumor (ACS 2018).

Entre os tumores de partes moles benignos com agressividade local, encontra-se a fibromatose, que se origina no tecido fibroso e se divide em superficial e profunda. A fibromatose superficial é menos agressiva e inclui a fibromatose palmar (Dupuytren), a fibromatose plantar (doença de Ledderhose) e a fibromatose peniana (doença de Peyronie) (DE BREE et al. 2004). Já a fibromatose profunda é clinicamente mais agressiva e é conhecida como fibromatose agressiva, fibromatose tipo desmoide ou tumor desmoide.

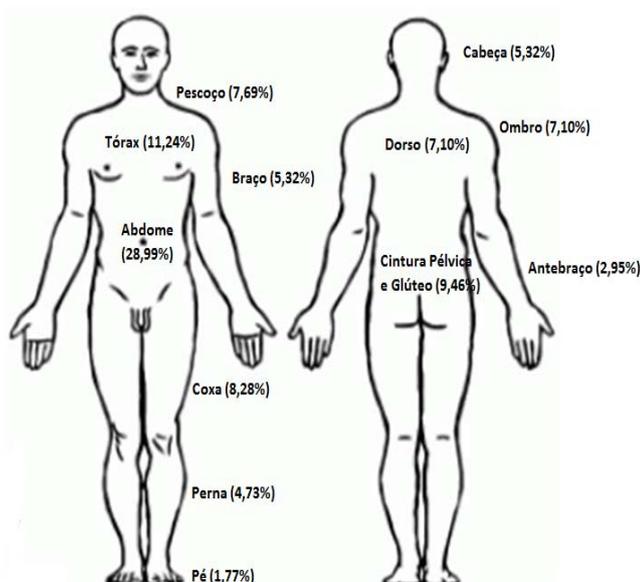
## 1.1 TUMOR DESMOIDE

O tumor desmoide, também conhecido por fibromatose músculo-aponeurótica ou ainda fibromatose agressiva é uma proliferação fibroblástica clonal que surge nos tecidos moles profundos e se caracteriza por ter um crescimento infiltrativo, com tendência à recidiva local, mas incapaz de metastatizar. Macroscopicamente, são lesões firmes, endurecidas, de coloração esbranquiçada, que se assemelham ao tecido cicatricial. A maioria dos tumores apresenta um tamanho entre 5 e 10 centímetros no maior eixo (GOLDBLUM e FLETCHER 2002). Microscopicamente, caracterizam-se pela proliferação de células alongadas, fusiformes, de aspecto monótono, apoiadas em um estroma colagenoso. Não há atipia ou hiper cromasia, o índice mitótico é variável e, na avaliação pela técnica de imuno-histoquímica, esse tumor expressa fortemente a proteína vimentina, moderadamente a actina de músculo liso e raramente a desmina e a proteína S-100 (Organização Mundial da Saúde-OMS) (GOLDBLUM e FLETCHER 2002).

As fibromatoses profundas podem ser divididas em fibromatose extra-abdominal, fibromatose abdominal e fibromatose intra-abdominal. As fibromatoses extra-abdominais surgem principalmente dos tecidos conectivos dos músculos, das fáscias ou dos tecidos músculo-aponeuróticos. As regiões que mais frequentemente são acometidas pelas fibromatoses extra-abdominais são ombros, cintura pélvica e coxas (ENZINGER e WEISS 2014b) e sua distribuição percentual por localização se encontra descrita na Figura 1. Os tumores desmoides abdominais são encontrados tipicamente nos músculos da parede abdominal e ocorrem principalmente durante a gravidez ou no período puerperal (ROBINSON et al. 2012), os tumores desmoides intra-abdominais afetam o mesentério.

NUYTTENS et al. (2000) e HOSALKAR et al. (2008) mostraram que os tumores desmoides são raros, correspondem a cerca de 0,03% de todas as neoplasias e cerca de 3% de todos os tumores de partes moles. A incidência estimada é de dois a quatro casos por milhão de habitantes por ano. A maioria deles desenvolve-se em adultos jovens entre os 10 e 40

anos. Não há predileção racial ou étnica; no entanto, história familiar pregressa de desenvolvimento de fibromatose agressiva é importante (MEAZZA et al. 2010). São marcados por fases de crescimento e progressão, estabilização e algumas regressões espontâneas. Embora eles não metastatizem, são muito infiltrativos, localmente destrutivos e têm um alto índice de recorrência, com taxas variando de 19% a 38% (KOTILIGAM et al. 2008). Nas crianças, as lesões extra-abdominais são as mais comuns e não há predileção por gênero. Já nos pacientes entre a puberdade e os 40 anos de idade, as mulheres são mais acometidas e as lesões da parede abdominal são as mais comuns. Nos pacientes mais idosos, não há predileção por gênero nem por localização (ENZINGER e WEISS 2014b).



**Figura 1** - Localização de 169 casos de tumores desmoides - Casuística A.C.Camargo Cancer Center 1980 – 2015

## 1.2 DIAGNÓSTICO

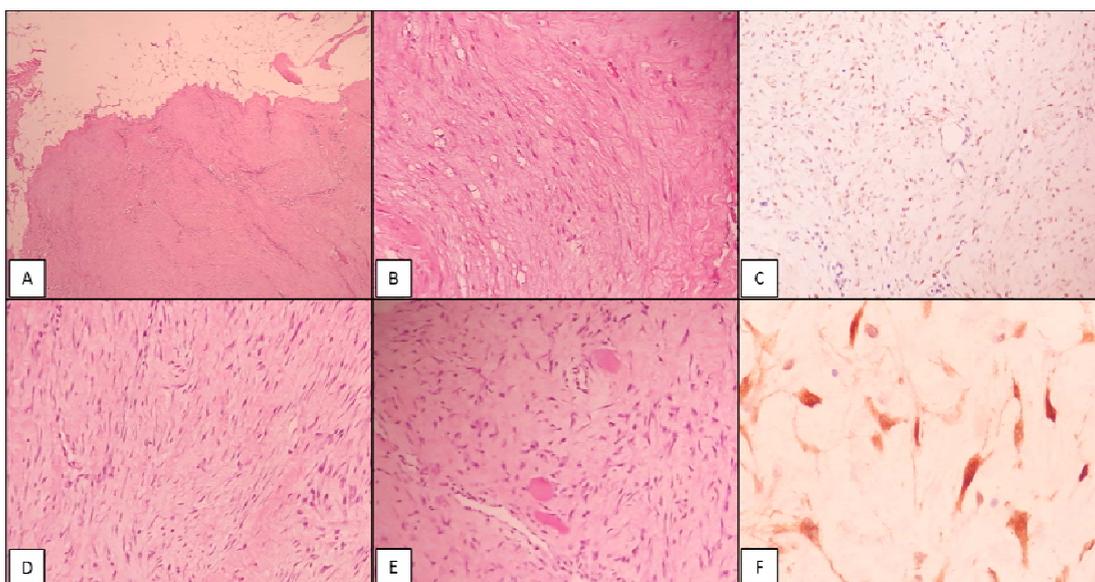
Os tumores desmoides podem se manifestar como uma massa de crescimento lento nos tecidos moles ao redor das cinturas pélvicas e escapulares, nos membros superiores ou inferiores, na cabeça e no

pescoço, na parede torácica e na parede abdominal. Podem ainda surgir das estruturas intra-abdominais e comprometer intestino, ureteres e estruturas neurovasculares. Sendo assim, exames de imagem, como ressonância magnética e tomografia computadorizada, são fundamentais para avaliar a extensão da lesão, sua localização, bem como a relação topográfica com as outras estruturas próximas à massa expansiva.

Os principais diagnósticos diferenciais clínicos dos tumores desmoides são os sarcomas de partes moles, linfoma extranodal, miosite ossificante e malformação arteriovenosa. As lesões benignas (miosite ossificante e malformações arteriovenosas) podem ser caracterizadas nas radiografias, tomografias computadorizadas e ressonância magnética por apresentarem calcificações no interior da lesão. O linfoma extranodal raramente se apresenta como um tumor muscular. Portanto, o diagnóstico diferencial principal dos tumores desmoides pelos exames de imagem é com os sarcomas de partes moles (LEE et al. 2006).

Conclui-se, então, que a confirmação diagnóstica será estabelecida pelos exames histológicos e imuno-histoquímicos. Entre os diagnósticos histológicos diferenciais dos tumores desmoides, estão os sarcomas fibroblásticos em um extremo (fibrossarcoma, sarcoma fibromixóide de baixo grau, leiomiossarcoma de baixo grau), passando pelos fibromas desmoplásicos, mixomas, fascíte nodular e, chegando ao outro extremo, há o tecido cicatricial hipertrófico e queloides (KASPER et al. 2011).

Em razão da semelhança histológica entre essas doenças distintas, o estudo imuno-histoquímico se faz necessário. Nesse contexto, a pesquisa da proteína vimentina, da actina de músculo liso e da betacatenina (Figura 2) tem sido cada vez mais empregada para a confirmação diagnóstica (GOLDBLUM e FLETCHER 2002; ENZINGER e WEISS 2014b).



**Fonte:** Departamento de Anatomia Patológica do A.C.Camargo Cancer Center

**Figura 2** - Fotomicrografia evidenciando estudo histológico e imuno-histoquímico comparando tecido cicatricial e o tumor desmoide. Lesão cicatricial, demonstrando limites bem definidos, não infiltrativos (A, H&E, 40x). Essas lesões são constituídas por fibroblastos em diversos estágios de maturação em estroma colagenizado (B, H&E 200x). Não se evidencia expressão imuno-histoquímica nuclear para betacatenina (C 100x). As fibromatoses, tipo desmoides, apresentam longos feixes de fibroblastos, também com colagenização estromal (D, H&E 200x). Diferentemente das cicatrizes, as fibromatoses apresentam padrão infiltrativo, como em músculo estriado (E, H&E 200x). A expressão de betacatenina exibe um padrão citoplasmático e nuclear (F, 400x).

### 1.3 ETIOLOGIA

A maioria dos tumores desmoides aparece esporadicamente, alguns têm relação com a gravidez, alguns com trauma e outros estão associados às síndromes hereditárias de predisposição a câncer como a *familial adenomatous polyposis* ou, em português, polipose adenomatosa familiar (FAP).

Segundo KASPER et al. (2011), as altas incidências desses tumores durante e após a gestação, a existência de tumores que se desenvolveram após exposição a medicamentos contraceptivos orais, e a regressão

espontânea de alguns tumores após a menopausa demonstram potencial influência dos hormônios sexuais femininos nesses tipos de tumores.

SCHLEMMER (2005) mostrou que 25% dos casos de tumores desmoides estavam associados aos traumas anteriores, sendo o trauma cirúrgico o mais associado.

Um estudo conduzido por FONG et al. (1993) evidenciou que a incidência de tumores desmoides em pacientes com FAP é 850 vezes maior do que a população em geral. SINHA et al. (2011), em uma metanálise sobre pacientes com FAP, observaram que os fatores de risco para o desenvolvimento de tumores desmoides foram: história positiva de tumor desmoide, sexo feminino e mutação germinativa no gene *adenomatosis polyposis coli* ou, em português, polipose adenomatose coli (*APC*). ESCOBAR et al. (2012) evidenciaram que 10% a 15% dos pacientes com FAP apresentaram tumores desmoides e sua maioria foi intra-abdominal, confirmando, assim, a forte relação da síndrome FAP e o desenvolvimento de tumores desmoides, principalmente por mutação germinativa no gene *APC*.

O gene *CTNNB1*, localizado no cromossomo 3p21, e o gene *APC*, localizado no cromossomo 5, são partes da via de sinalização celular Wnt, a qual deve estar inativada nas células diferenciadas, e as mutações germinativas com perda de função do gene *APC* ou as mutações somáticas ativadoras no gene *CTNNB1*, que ocorrem preferencialmente em códons específicos da proteína, são eventos genéticos importantes responsáveis pela ativação da via Wnt em tumores desmoides associados ao FAP e esporádicos, respectivamente.

A expressão da proteína betacatenina está aumentada nos tumores desmoides em pacientes com FAP (mutação germinativa no gene *APC*) ou com mutação somática no gene *CTNNB1* e tem localização nuclear, o que sinaliza a ativação da via Wnt/betacatenina. A degradação da proteína betacatenina pelo complexo destruidor formado por multiproteínas (consistindo das proteínas *APC*, *axis inhibitor* (*AXIN*), glicogênio sintase quinase-3 beta (*GSK-3 beta*) e outras) é prejudicada em células com

mutação nesses genes, levando a um acúmulo da betacatenina nuclear. Subsequentemente, a betacatenina nuclear ativa o fator T-cell (TCF) (KOTILIGAM et al. 2008; LAZAR et. al. 2008).

Observa-se, também, a existência de um grupo de pacientes portadores de tumores desmoides esporádicos, cerca de 7% a 27% dos casos (MULLEN et al. 2013; AITKEN et al. 2015) sem evidências de alterações moleculares no gene codificante da betacatenina. Uma das possíveis explicações para os casos negativos é a ocorrência de mutações em outras localizações do éxon 3. Nesse sentido, LE GUELLEC et al. (2012) e AITKEN et al. (2015) demonstraram alguns poucos espécimes com mutações em outros códons da betacatenina, por exemplo, nos códons 34 e 37. Entretanto, ainda observaram um grupo sem mutações evidentes. Uma outra explicação seria a ocorrência de mutações somáticas no gene *APC* em alguns desses desmoides clinicamente considerados não FAP, ou seja, tumores esporádicos. CRAGO et al. (2015) identificaram dois pacientes com mutação no gene *APC* entre seus oito pacientes considerados inicialmente com tumores selvagens, e ambos também apresentaram a perda do número de cópias em um trecho do cromossomo 5, que engloba o *APC*, sugerindo um segundo *hit* que contribui para o desenvolvimento desses tumores.

Ainda podem existir outros genes associados ou não à via de sinalização Wnt com mutações associadas ao desenvolvimento de tumores desmoides. CRAGO et al. (2015) também mostraram um caso de mutação no gene ativador da sinalização de Wnt (*BMI1*). Em dois espécimes, nenhuma mutação nos genes que regulam a sinalização de Wnt (*CTNNB1*, *APC* ou *BMI1*) foi encontrada, mas a análise demonstrou a perda do cromossomo 6.

Além da associação dos tumores desmoides às síndromes, como a FAP e mutações no gene da betacatenina, diferentes alterações cromossômicas foram documentadas nessa neoplasia, particularmente a ocorrência das perdas do cromossomo 6q, 5q, trissomia dos cromossomos 8 e 20 e monossomia do cromossomo 20. A presença da trissomia dos

cromossomos 8 e 20 ocorreu entre 25% e 30% dos tumores, e a proporção de células afetadas variou entre 2% e 25% (SALAS et al. 2010).

#### **1.4 TRATAMENTO**

Os pacientes sintomáticos ou com doença progressiva podem ser tratados por meio de cirurgia com ressecção ampla, radioterapia, quimioterapia, medicamentos anti-inflamatórios não esteroidais, antiestrogênicos e inibidores da tirosina quinase. Todos esses métodos apresentam resultados não muito satisfatórios, o que torna difícil a determinação do melhor tratamento para esses tumores, e o manejo multidisciplinar apresenta-se como a abordagem mais eficaz (PAPAGELOPOULOS et al. 2006).

A cirurgia é um dos pilares terapêuticos no tratamento dos tumores desmoides (KASPER et al. 2011). A ressecção com margem ampla tem sido a principal opção para o controle local desses tumores em todos os grupos etários (STOUT 1954; RAO et al. 1987; POSNER et al. 1989; FAULKNER et al. 1995; PRITCHARD et al. 1996; GOY et al. 1997; WEISS e GOLDBLUM 2001; OVERHAUS et al. 2003; ABBAS et al. 2004).

Embora muitas vezes seja difícil alcançar margens adequadas por causa da extensão e da invasividade desse tumor, a ressecção com margens amplas oferece a melhor chance de evitar a recorrência local (STOUT 1954; RAO et al. 1987; PRITCHARD et al. 1996; GOY et al. 1997; WEISS e GOLDBLUM 2001; DUGGAL et al. 2004).

Os tumores desmoides frequentemente recorrem após a cirurgia, e os benefícios da cirurgia radical devem ser avaliados contra a potencial morbidade do tumor, visto que as taxas de complicações cirúrgicas são altas (PAPAGELOPOULOS et al. 2006).

Sendo assim, dada a importância do sítio tumoral, da variabilidade da evolução clínica, da possibilidade de mutilação e das altas taxas de recorrência após a cirurgia, a aplicação e o uso de intervenção cirúrgica têm sido amplamente discutidos na literatura (MELIS et al. 2008; NAKAYAMA et al. 2008; SHIDO et al. 2009).

A radioterapia pré ou pós-operatória tem um importante papel no tratamento dos sarcomas de partes moles, mas seu papel no tratamento dos desmoides não é claramente definido. Essa modalidade terapêutica tem sido empregada na tentativa de controlar a doença residual com adjuvante à excisão e, também, como uma alternativa às ressecções mutilantes (SHIELDS et al. 2001).

NUYTTENS et al. (2000) analisaram 22 artigos sobre tratamento de tumores desmoides, abrangendo 234 pacientes tratados com cirurgia exclusiva e 80 pacientes tratados com radioterapia exclusiva, e as taxas de controle foram de 62% e 83%, respectivamente.

A radioterapia é efetiva no controle local dos desmoides, no entanto, se uma cirurgia não mutilante puder ser realizada, o resultado, no controle da doença, será mais duradouro. Todavia, quando a ressecção adequada não mutilante não for possível, a radioterapia exclusiva pode ser consideravelmente efetiva em pacientes selecionados (BERRI et al. 2011).

A quimioterapia citotóxica tem sido usada em tumores desmoides não ressecáveis, doenças residuais ou progressivas e, em alguns raros casos, em terapias neoadjuvantes para facilitar a ressecção com margem ampla. Embora a aparência histológica possa sugerir o contrário, os tumores desmoides respondem bem à quimioterapia com alívio dos sintomas e, ocasionalmente, com regressão durável da doença. Em crianças, a quimioterapia combinada pode ser indicada para doença irressecável ou nos casos em que o controle local não pode ser alcançado (GOEPFERT et al. 1982; KINZBRUNNER et al. 1983; RANEY et al. 1987; KLEIN et al. 1987; WADDELL e KIRSCH 1991; RANEY 1991; SPORTIELLO e HOOGERLAND 1991; FAULKNER et al. 1995; BAUERNHOFER et al. 1996; LEWIS et al. 1999).

O uso de anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) para o tratamento dos tumores desmoides está relacionado com o papel que a cicloxigenase 2 (COX2) exerce na patogênese desses tumores, pois, como já foi demonstrado por SIGNORINI et al. (2007), essa enzima tem influência na via de sinalização da betacatenina. Uma variedade de AINES tem sido

testada no tratamento desses tumores e está associada com respostas parciais a completas em uma série de estudos não randomizados retrospectivos (JANINIS et al. 2003).

A manipulação hormonal tem sido explorada como uma forma de controle da doença mostrando taxa de resposta de nulo a satisfatória (SANTOS et al. 2010). Vários agentes hormonais foram testados e considerados eficazes, tais agentes incluem tamoxifeno e toremifeno, progesterona, acetato de medroxiprogesterona, prednizolona, testolactona e goserelina. Um dos antiestrogênios mais utilizados no tratamento dos tumores desmoides é o tamoxifeno em doses que variam de 20 mg/dia a 160 mg/dia (JANINIS et al. 2003).

A terapia-alvo específica vem sendo estudada como novo arsenal terapêutico para o tratamento dos tumores desmoides. O Imatinib, o Sorafenibe e outros medicamentos-alvo específicos vêm sendo testados em estudos clínicos. Recentemente, um estudo prospectivo e randomizado mostrou a eficácia de Sorafenibe 400 mg/dia comparado com placebo para pacientes com tumor desmoide que apresentavam progressão da doença e/ou dor não controlada. Esse estudo apresentado no Congresso da *American Society of Clinical Oncology* (ASCO), em português, Sociedade Americana de Oncologia Clínica, mostrou que, dos 87 pacientes randomizados, a sobrevida livre de progressão em um ano foi de 87% para o braço Sorafenibe e de 43% para o braço placebo (GOUNDER et al. 2018). Outro estudo prospectivo e randomizado mostrou a eficácia de Pazopanibe quando comparado com Metotrexato e Vinblastina (TOULMONDE et al. 2018).

O tratamento combinado incorporando diferentes modalidades de tratamento, como cirurgia, radioterapia, quimioterapia e outros, tem sido considerado adequado para muitos pacientes com tumores desmoides complexos (BERRI et al. 2011). Segundo o estudo de LEV et al. (2007), os pacientes que tiveram alguma forma de terapia combinada apresentaram uma taxa de recorrência global de 15%, a qual foi menor do que a de cirurgia exclusiva ou radioterapia exclusiva.

Em muitos pacientes com tumores desmoides, a ressecção cirúrgica radical da doença pode ser pior do que a própria doença. Atualmente, vários centros de tratamento vêm propondo uma abordagem conhecida como *espera e observação*. Vários estudos têm mostrado as taxas de sobrevivência livres de progressão da doença em cinco anos de aproximadamente 50% com essa abordagem (BONVALOT et al. 2008; FIORE et al. 2009; BRIAND et al. 2014).

Todas essas abordagens apresentam resultados muito variados e frequentemente insatisfatórios, o que torna essa doença, além de muito mórbida, incapacitante e, às vezes, mutilante. Estudos prospectivos e randomizados devem ser desenhados na forma de melhor avaliar e comparar as diversas modalidades de tratamento, como o objetivo de minimizar as complicações associadas a essa complexa e enigmática doença.

## 1.5 VIA DE SINALIZAÇÃO WNT/BETACATENINA

O gene *Wnt1* foi descrito em 1982 por NUSSE e VARMUS e, originalmente, nomeado como INT-1. O termo *Wnt* origina-se da combinação do gene *Wingless*, responsável pelo desenvolvimento das asas em *Drosophila*, com o proto-oncogene *Int-1*, responsável pelo desenvolvimento de tumores mamários quando ativado em camundongos (CLEVERS e NUSSE 2012).

As primeiras conexões diretas entre a via de sinalização *Wnt* e doenças humanas começaram no início dos anos 90. O gene *APC* foi descrito independentemente em uma síndrome hereditária de câncer denominada polipose familiar adenomatosa (FAP) (NISHISHO et al. 1991). Logo depois, a proteína citoplasmática *APC* mostrou-se interagir com a betacatenina (RUBINFELD et al. 1993; SU et al. 1993). Muitos outros componentes adicionais dessa via de sinalização e de doenças conectadas a ela foram descritos nas últimas duas décadas (CLEVERS e NUSSE 2012).

As proteínas da via Wnt constituem uma grande família de ligante secretado rico em cisteína que controla o desenvolvimento em organismos desde os nematoides até os mamíferos. A via intracelular de Wnt é, também, evolutivamente conservada e regula a proliferação celular, morfologia, motilidade, destino, formação de eixo e desenvolvimento de órgãos (WODARZ e NUSSER 1998; POLAKIS 2000; KIKUCHI 2003).

A sinalização Wnt regula pelo menos três diferentes vias: a canônica, dependente de betacatenina (via Wnt/betacatenina); a polaridade celular planar; e a cálcio iônico ( $Ca^{2+}$ ). Embora os componentes dessa Wnt via possam diferir entre os diversos organismos, o ponto em comum dessa via entre os organismos é a regulação da transcrição gênica mediada pela betacatenina (POLAKIS 2000). Sendo assim, a betacatenina apresenta um papel duplo em células epiteliais, agindo como molécula de adesão celular e, também, no processo de transcrição do núcleo (BARKER 2008).

Diversos estudos têm demonstrado que anormalidades na via Wnt/betacatenina levam à formação de tumores (KIKUCHI 2003). De acordo com o modelo atual mais amplamente aceito da via Wnt/betacatenina, os níveis de betacatenina são controlados por meio de um complexo de destruição, que mantém a betacatenina fora do núcleo enquanto promove sua degradação. Na ausência de um sinal Wnt, a betacatenina liga-se ao complexo de destruição e, por meio da fosforilação, é degradada pelo proteossomo. O complexo de destruição é formado por pelo menos quatro proteínas: uma serina/treonina-quinase, conhecida como caseína quinase 1 (CK1), que fosforila a serina 45 da betacatenina, marcando-a, assim, para ser fosforilada na treonina 41 e, sequencialmente, 37 e 33 por outra serina treonina quinase, conhecida como glicogênio sintase-3 beta (GSK-3 beta). Essa última fosforilação é responsável por marcar a proteína betacatenina para ubiquitinação, que resulta em degradação pelo proteossomo. A proteína APC, juntamente com outra proteína conhecida como axina, é responsável por estabilizar o complexo de destruição (XU e KIMELMAN 2007). Na ausência de betacatenina no núcleo, a proteína fator celular-T

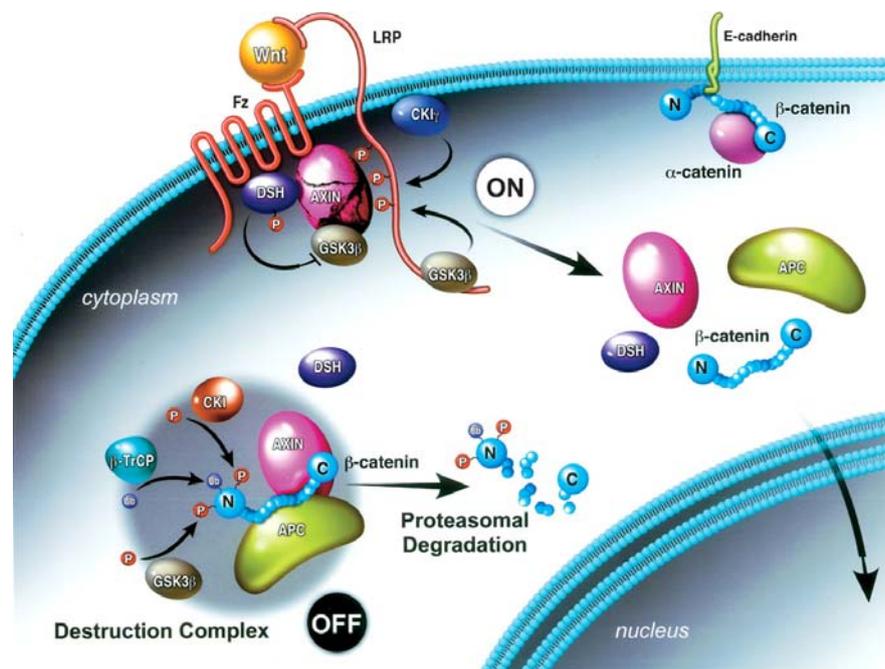
(TCF) e o fator intensificador de linfócito (LEF) ligam-se aos correpressores GRO/TLE e CTBP, resultando na supressão da transcrição dos genes-alvo.

As proteínas TCF/LEF são as que atuam como adaptadores, ligando-se ao DNA e curvando o mesmo, permitindo que outros fatores de transição se liguem e alterem a transcrição de genes-alvo. Ambos GRO/TLE e CTBP interagem com histona desacetilase para silenciar a transcrição de determinados genes, por meio da alteração da estrutura da cromatina (COUREY e JIA 2001; BRAGGIO 2015).

A ativação da via Wnt/betacatenina dá-se após a ligação do ligante Wnt aos receptores de superfície celular, que inclui sete proteínas transmembranares chamadas Frizzled e a proteína 5 relacionada a receptor de lipoproteína (LRP5) e a proteína 6 relacionada a receptor de lipoproteína (LRP6), que são proteínas de baixa densidade relacionada com receptor de lipoproteínas de baixa densidade (LDL). Quando ativadas pela ligação de Wnt, os receptores recrutam e fosforilam uma proteína do citoplasma chamada *dishevelled* (DVL). A proteína *dishevelled*, quando fosforilada, previne a fosforilação da betacatenina pelo complexo APC/AXINA/CK1/GSK-3 beta (KIKUCHI et al. 2007). A betacatenina não fosforilada acumula-se no citoplasma e, em seguida, transloca-se para o núcleo. Uma vez no núcleo, a betacatenina liga-se aos membros da família TCF/TEF para formar um complexo estável do deslocamento de GRO/TLE (DANIELS e WEIS 2005), o que permite que a betacatenina recrute uma variedade de coativadores que são necessários para sua atividade transcricional, resultando na ativação da transcrição de genes, como CYCD1 e MYC que, geralmente, promovem a proliferação e sobrevivência celular e, em alguns contextos, a diferenciação celular (BRAGGIO 2015).

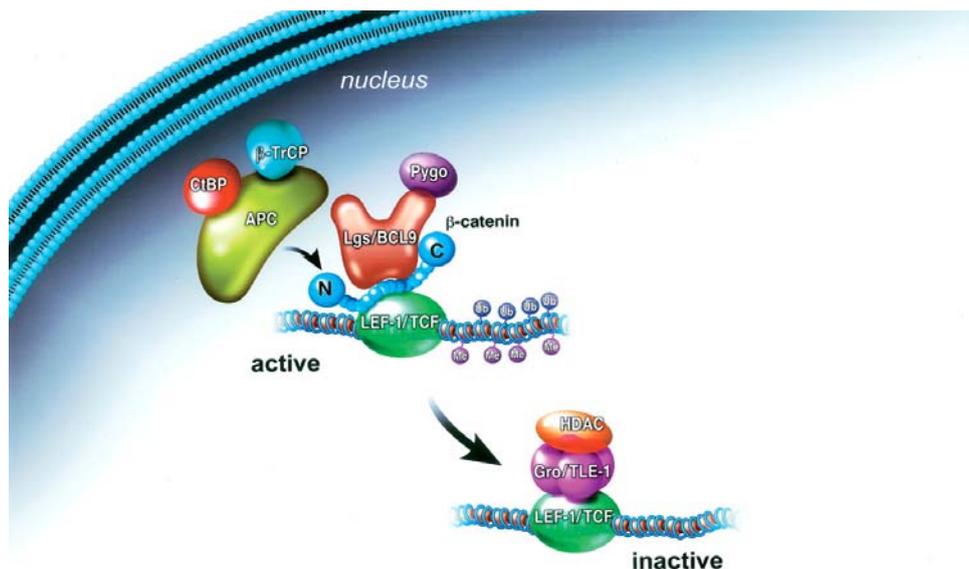
Dada a importância de sinalização Wnt à biologia da célula-tronco adulta, não é surpreendente que mutações na via de sinalização Wnt sejam frequentemente observadas em câncer, particularmente nos tecidos que normalmente dependem dessa via para renovação própria e reparo (CLEVERS e NUSSE 2012).

A manifestação de câncer pela ativação aberrante Wnt é em grande parte resultado de mutações ativadoras na proteína betacatenina, levando à sua maior estabilidade. Vários alvos de genes envolvidos na via de sinalização da betacatenina têm sido identificados e algumas de suas funções são consistentes com controle do crescimento celular, diferenciação e apoptose. No entanto, a identificação de genes-alvo que não contêm sítios ligantes TCF/LCF em seus promotores fornecerá um novo modelo de ativação de genes pela via de sinalização Wnt (KIKUCHI 2003).



Fonte: Modificado de WILLERT e JONES (2006).

**Figura 3** - Via de sinalização Wnt - os principais reguladores desta via são encontrados na membrana plasmática e em vários complexos citoplasmáticos.



Fonte: Modificado de WILLERT e JONES (2006).

**Figura 4** - Via de sinalização Wnt - Modelo para regulação transcricional de genes-alvo Wnt.

## 1.6 O GENE DA BETACATENINA (*CTNNB1*)

As moléculas de adesão celular (CAMs) relacionadas às integrinas, seletinas, caderinas e imunoglobulinas constituem as quatro maiores famílias de moléculas de adesão celular que foram revisadas recentemente (KEMPLER 1993). Tem sido demonstrada a interação de um conjunto de proteínas citoplasmáticas denominadas alfa, beta e gamacateninas com a cauda citoplasmática das caderinas. As cateninas são mediadores estruturais para a junção dos filamentos de actina do citoesqueleto às caderinas (KRAUS et al. 1994). Análises comparativas das sequências de aminoácidos sugerem que a alfacatenina é homóloga à vinculina e tem sido sugerido que a gamacatenina seria à placoglobulina. A betacatenina está relacionada à placoglobulina (BUTZ et al. 1992) homóloga à proteína armadillo, encontrada nas *Drosophilas* (MCCREA et al. 1991).

A proteína betacatenina é codificada pelo gene *CTNNB1* que se encontra no cromossomo 3p 21, tem peso molecular de 92 KDa (KRAUS et al. 1994), é composta por três domínios principais, sendo um domínio N-

terminal, um domínio central de repetição armadillo e um domínio C-terminal (GOTTARDI e GUMBINER 2004). Segundo CLEVERS e NUSSE (2012), a betacatenina desempenha um papel essencial no desenvolvimento e na manutenção dos tecidos. Funcionalmente, a betacatenina está envolvida nas interações célula-célula (por meio de junções aderentes por meio de ligação à E-caderina e à alfacatenina na superfície celular) e na regulação da expressão gênica, por meio da ativação da via Wnt, resultando na translocação de betacatenina para o núcleo, interagindo com os reguladores de transcrição da família TCF/LEF (BARKER 2008).

Vários autores já descreveram que as mutações no gene *CTNNB1* estão presentes em diversas entidades patológicas (TEJPAR et al. 1999). MIYOSHI et al. (1998) evidenciaram que as mutações no gene da betacatenina são muito frequentes nos tumores desmoides esporádicos e, também, em 1998, SPARKS et al. afirmaram que as mutações dos genes *APC* e *CTNNB1* são mutuamente exclusivas. Alguns estudos recentes demonstraram que a vasta maioria dos tumores desmoides esporádicos encontram mutações no gene *CTNNB1* e não no gene *APC* (MULLEN et al. 2013). As mutações no gene codificador da betacatenina ocorrem no éxon 3, na região codificadora do domínio de fosforilação da betacatenina (LAZAR et al. 2008). E três discretas mutações específicas em dois códons do gene *CTNNB1* foram identificadas: uma na treonina 41 (T41A), que altera o aminoácido treonina para alanina, e duas na serina 45 (S45F e S45P), que alteram o aminoácido serina para fenilalanina e serina para prolina, respectivamente (ALMAN et al. 1997; TEJPAR et al. 1999; AMARY et al. 2007).

LAZAR et al. (2008) evidenciaram que a expressão nuclear da betacatenina ocorreu em 98% dos espécimes de seus pacientes com tumores desmoides, e mutações no gene *CTNNB1* foram demonstradas em 85% de seus casos de tumores desmoides esporádicos. A partir desses achados, diversos estudos avaliaram o papel diagnóstico da análise mutacional da betacatenina, e seus resultados demonstram que essa análise pode ser muito útil para a confirmação diagnóstica dos possíveis casos de tumores desmoides (COLOMBO et al. 2011).

LAZAR et al. (2008) também observaram que as mutações no códon 45 podem predizer um risco aumentado de recorrência local. Somente 23%

dos pacientes com a mutação S45F estavam livres de recorrência da doença após cinco anos. Cinquenta e nove por cento dos pacientes com a mutação T41A e 65% com mutação no gene *APC* estavam estáveis.

Em outro estudo, MULLEN et al. (2013) avaliaram a prevalência de mutações no gene *CTNNB1* em um grupo de pacientes com tumor desmóide esporádico, incluindo, em sua amostra, os tumores desmóides primários, os recidivados, os extra e os intra-abdominais. As mutações no gene *CTNNB1* ocorreram em 73% dos pacientes e todas as mutações estavam localizadas nos códons 41 e 45. A mutação T41A foi encontrada em 46% da amostra, a S45F, em 25%; a S45P, em 1,7%; a S45C, em 0,9%; e foram encontradas uma mutação T41A e uma S45P. MULLEN et al. (2013) também verificaram que a sobrevida livre de recorrência em cinco anos foi ligeiramente pior, embora não estatisticamente significativa, nos pacientes com mutação do *CTNNB1* (58%) quando comparados com o grupo selvagem (74%). E, quando se avaliam as mutações genótípicas T41A e S45F, nenhuma diferença foi detectada. Há ainda outros autores que reproduziram os achados de LAZAR et al. (2008), como COLOMBO et al. (2013), mas esse assunto ainda é controverso.

## 1.7 O SEQUENCIAMENTO DE PRÓXIMA GERAÇÃO (NGS)

A decodificação do genoma humano tem promovido pistas importantes sobre doenças de origem genética, assim como o desenvolvimento de prevenção mais específica, os diagnósticos e as estratégias terapêuticas têm dirigido sequenciamentos extensivos e esforços para mapeamento nas últimas décadas. Depois de completado o sequenciamento do primeiro genoma humano em 2004, a necessidade crescente de sequenciar um grande número de genomas de forma rápida, com baixo custo e caminhos acurados mudaram a direção do método de sequenciamento tradicional de Sanger para um novo método com alta taxa de transferência de tecnologia genômica (XUAN et al. 2013; AITKEN et al. 2015; DUNCAVAGE e TANDON 2015).

Em 2005, emergiu a primeira plataforma de sequenciamento paralelo massivo dando início a uma nova era de sequenciamento genético que foi chamada de sequenciamento de nova geração ou sequenciamento de

próxima geração ou, em inglês, *next generation sequencing* (NGS) (MARGULIES et al. 2005; e SHENDURE et al. 2005). Nos últimos anos, o NGS começou a suplantiar outras tecnologias. Esse método de sequenciamento pode analisar o genoma humano inteiro em dias ou, ainda, avaliar regiões específicas do genoma em um tempo clinicamente útil (ULAHANNAN et al. 2013).

As plataformas de nova geração têm como base o sequenciamento, em paralelo, de um vasto número de fragmentos genômicos com tamanho entre 35 e 400 pares de base. Esses fragmentos são amplificados clonalmente por reação de cadeia de polimerase em emulsão, por uma imobilização em uma superfície sólida ou por amplificação de uma nanoesfera. Posteriormente, a reação de sequenciamento é realizada, e a detecção dos nucleotídeos incorporados pode ser observada pela emissão de luz fluorescente a cada nucleotídeo adicionado ou pela mudança de pH. Embora fundamentado em conceitos similares, as características específicas de cada plataforma levam a diferentes velocidades, comprimentos de fragmentos sequenciados (*reads*) e acurácias.

Entre todas as plataformas de NGS, as mais utilizadas consistem nas plataformas Illumina e Ion Torrent. Em geral, a escolha do sequenciador para o uso clínico vai depender da melhor combinação de custo, flexibilidade, taxas de erro e de transferência, bem como de programas de análise pós-sequenciamento para uma determinada aplicação (ULAHANNAN et al. 2013). Além disso, essa tecnologia permite quantificar a porcentagem de mutação dentro de cada caso estudado, por meio da análise do número de leituras da variante de interesse no total de leitura de cada base. Esse índice também é conhecido como fração de alelo variante ou, do inglês, *variant allele fraction* (VAF), do inglês, ou frequência alélica (FA).

O sequenciamento de nova geração tem sido utilizado para caracterizar vários tipos de câncer e projetos de sequenciamento de larga escala, como *The Cancer Genome Atlas* (<http://cancergenome.nih.gov>) e o *Internacional Cancer Genoma Consortium* (<http://icgc.org>). O sequenciamento de nova geração poderá revolucionar a oncologia, com a habilidade de desenhar e usar drogas-alvo, predizer resultados e respostas e classificar os tumores. Essa técnica está se tornando continuamente mais

barata, rápida e confortável, com capacidade para identificar raras e ainda importantes mutações somáticas (ULAHANNAN et al. 2013; XUAN et al. 2013; TORREZAN et al. 2014). Esses e outros fatores nos levaram a utilizar o NGS como ferramenta fundamental para análise das mutações nos tumores desmoides neste presente trabalho.

## 1.8 JUSTIFICATIVA

Os tumores desmoides podem apresentar diferentes comportamentos clínicos: há lesões com comportamento indolente, outras pouco agressivas e algumas muito agressivas, com altas taxas de recidiva. Assim sendo, são tumores ainda enigmáticos no que se refere a seu comportamento clínico.

Os estudos de biologia molecular e genética demonstraram uma associação dos tumores desmoides às mutações germinativas no gene *APC* e esporádicos no gene codificador da betacatenina. Alguns grupos evidenciaram que a vasta maioria dos tumores desmoides esporádicos apresentam mutações do gene *CTNNB1*, mas não no gene *APC*. E três mutações específicas em dois códons desse gene foram frequentemente identificadas: uma na treonina 41 (T41A) e duas na serina 45 (S45F e S45P) (MULLEN et al. 2013).

Os primeiros trabalhos que identificaram a mutação no gene codificador da betacatenina nos tumores desmoides reportavam uma frequência de mutação que variava de 30% a 50% entre diferentes grupos de amostras (MIYOSHI et al. 1998; TEJPAR et al. 1999). Com o passar dos anos e, conseqüentemente, com o desenvolvimento da tecnologia NGS, capaz de aumentar a sensibilidade das técnicas de sequenciamento, foi possível detectar a mutação somática do *CTNNB1* em 85% dos pacientes (LAZAR et al. 2008; COLOMBO et al. 2011). Assim, fica claro que, quanto maior a sensibilidade do método utilizado para o sequenciamento, maior será a capacidade de identificar tumores com presença de mutação, aumentando a frequência de tumores desmoides mutados em *CTNNB1*.

Também houve, na literatura, controvérsias quanto às recidivas dos tumores desmoides esporádicos, de acordo com a mutação do gene codificador da betacatenina. Alguns autores concluíram que a mutação S45F tem uma tendência maior à recidiva local. No entanto, alguns outros

autores, que também realizaram essa análise, não conseguiram poder estatístico para comprovar essa tendência.

Questionou-se, ainda, se, para avaliar a evolução clínica e o prognóstico desses pacientes, bastaria saber se o paciente apresentava ou não mutação no gene *CTNNB1* ou se a fração de alelo variante (VAF), também conhecida como frequência alélica (uma relação expressa em porcentagem entre o número de leituras da variante de interesse no total de leituras de base), teria alguma influência sobre as características clínicas ou sobre o prognóstico.

Pelo exposto acima, optou-se por avaliar ao nível molecular os pacientes tratados em nossa instituição, por meio da caracterização das mutações do gene codificador da proteína betacatenina, a fração de alelo variante/frequência alélica em cada tumor e sua associação com o prognóstico. Assim sendo, espera-se confirmar ou não alguns fatores de risco para a recidiva local, bem como fornecer uma estimativa de risco de progressão da doença após o tratamento cirúrgico e adequar melhor um tratamento para os diferentes tipos de tumores desmoides.

A última fase deste projeto consiste na identificação de mutações em outros genes em tumores sem mutação no éxon 3 de *CTNNB1* para identificar outras vias potenciais associadas ao surgimento do tumor desmoide.

## **2 OBJETIVO**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar a incidência das mutações nos códons 41 e 45 do gene *CTNNB1* em pacientes com tumores desmoides esporádicos por sequenciamento de próxima geração (NGS).

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- a) Caracterizar demográfica, epidemiológica e clinicamente os pacientes portadores de tumores desmoides tratados no A.C.Camargo Cancer Center e submetidos à ressecção cirúrgica.
- b) Identificar fatores prognósticos relacionados à recidiva local e à sobrevida livre de recidiva local.
- c) Correlacionar a mutação no gene codificante da betacatenina com a taxa de sobrevida livre de recidiva local.
- d) Identificar modelo preditivo de recidiva local com fatores demográficos, clínicos e moleculares em tumores desmoides tratados com cirurgia.
- e) Avaliar a fração de alelo variante/frequência alélica das mutações nos códons 41 e 45 do gene da betacatenina nos casos em que forem identificadas as mutações.
- f) Buscar outros genes mutados em tumores negativos para mutação nos códons 41 e 45 do gene da betacatenina.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de um estudo retrospectivo, transversal e unicêntrico de análise de dados obtidos do registro de prontuário.

#### 3.1 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Este trabalho foi submetido à avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) em seres humanos da Fundação Antônio Prudente do A.C.Camargo Cancer Center, de São Paulo, e foi aprovado conforme parecer de nº 2.091/15, de 10 de novembro de 2015 (Anexo 1).

#### 3.2 CASUÍSTICA

Realizou-se busca no registro de câncer do A.C.Camargo Cancer Center no período de 1980 a 2015, utilizando os termos fibromatose profunda, tumor desmoide e fibromatose agressiva.

Os dados foram coletados dos prontuários do Serviço de Arquivo Médico Estatístico (SAME) do referido hospital e sumariados em formulário padronizado (Apêndice 1). Confeccionou-se uma planilha em *software* específico, constituindo, assim, uma base de dados para análise epidemiológica e clínica. Todos os pacientes avaliados tiveram suas amostras de material emblocado em parafina submetidos à revisão histológica pela médica patologista do A.C.Camargo Cancer, Dra. Isabela Werneck Cunha, a fim de revisar o diagnóstico histopatológico e seu respectivo *status* de margem.

#### **Critérios de Inclusão:**

##### **Os pacientes deste estudo devem:**

1. ter diagnóstico de tumor desmoide, fibromatose profunda ou fibromatose agressiva;

2. apresentar dados clínicos e demográficos adequados disponíveis no prontuário;
3. ter sido submetidos ao tratamento cirúrgico para a ressecção da lesão com intuito curativo;
4. ser pacientes operados e não recidivados com seguimento mínimo de 24 meses; e
5. apresentar lâminas e/ou blocos de parafina disponíveis para revisão do estudo anatomopatológico;

**Critérios de Exclusão:**

Pacientes com diagnóstico de tumor desmoide associado à polipose adenomatosa familiar (FAP) devem ser excluídos.

**3.3 VARIÁVEIS CLÍNICAS E DEMOGRÁFICAS**

As variáveis clínicas e demográficas analisadas foram: gênero, idade, raça, topografia, localização anatômica, maior diâmetro do tumor primário.

A variável idade foi analisada de forma contínua e categorizada em dois grupos, sendo um deles subdividido em pacientes com idade entre 0 e 24 e 25 e 49, 50 e 75 anos, e o outro subdividido em pacientes com menos de 31 anos e mais de 31 anos. Essa idade específica foi determinada pelo método de obtenção de ponto de corte (*cut-off*) calculado por meio da maximização da estatística *log-rank* padronizada (LAUSEN e SCHUMACHER 1992).

Da mesma forma, categorizou-se a variável tamanho do tumor de acordo com o ponto de corte (*cut-off* = 10 centímetros) e em tumores menores ou iguais a 5 centímetros, entre 5 e 10 centímetros, e maiores de 10 centímetros.

A variável localização foi subdividida em topografia 1 (abdominal e não abdominal), topografia 2 (extremidades e não extremidades) e localização anatômica: abdome não parede, parede abdominal, tronco/dorso, cabeça/pescoço e extremidades.

As variáveis de tratamento consideravam situação do paciente na admissão; número de cirurgias prévias (cirurgias para ressecção do tumor primário com intuito curativo realizadas em outra instituição); biópsia prévia (biópsia realizada em outra instituição); tipo de tratamento (cirurgia, cirurgia e quimioterapia, cirurgia e radioterapia, cirurgia e quimioterapia e radioterapia); tipo de tratamento categorizado (pacientes submetidos apenas à cirurgia e pacientes submetidos à cirurgia associada à quimioterapia, à radioterapia ou a ambas as modalidades); tipo de cirurgia (ressecção ampliada, amputação/ desarticulação, biópsia excisional); e tempo de seguimento e margens.

Em relação às margens, optou-se por dividir os pacientes em apenas dois grupos: o de pacientes com margens livres e o de pacientes com qualquer comprometimento das margens (R1 – microscopicamente comprometida ou R2 – macroscopicamente comprometida). Já em relação ao seguimento, os pacientes foram classificados em vivo sem doença, vivo com doença, vivo sem outra especificação, óbito decorrente da doença ou de complicações do tratamento, óbito sem a doença, óbito sem outra especificação e perdidos no seguimento.

### **3.4 EXTRAÇÃO DO DNA**

As amostras de material embocado em parafina dos pacientes submetidos ao tratamento cirúrgico, que cumpriam os critérios de inclusão e não apresentavam critério de exclusão, foram obtidas no setor de Arquivo do A.C.Camargo Cancer Center. Um patologista qualificado realizou a revisão histológica das lâminas, confirmou o diagnóstico, identificou na lâmina a região em que havia mais de 95% de células tumorais viáveis e marcou o local de interesse para extração do DNA. Para extrair a região-alvo, foi feito um *punch* (captura por um cilindro de 1 milímetro de diâmetro) do local marcado no bloco de parafina, e esse tecido capturado foi transferido para um tubo de microcentrifugação de 1,5 mililitro (ml) para extração do DNA.

Procedeu-se à retirada do DNA no Banco de Macromoléculas dessa instituição, de acordo com o protocolo operacional padrão desse departamento. Os tecidos foram desparafinizados com três banhos de xilol e o *pellet* obtido foi lavado com etanol absoluto para remoção do xilol. Depois da secagem do *pellet*, esse tecido foi digerido com 600 microlitros ( $\mu\text{L}$ ) de solução de lise (Cell Lysis Solution Genra Puregene – Qiagen) e 300 microgramas ( $\mu\text{g}$ ) de proteinase K, por 18 horas a 55 graus Celsius sob agitação em um Termomixer (Eppendorf). Após homogeneização completa do tecido, realizou-se o tratamento com 200 microgramas de ribonuclease (RNase) A e, depois da incubação, a solução foi transferida para um tubo *Phase Lock Gel* (PLG) (Eppendorf). Foram adicionados fenol, clorofórmio, álcool isoamílico (25/24/1) (Sigma Aldrich Corporations) e, por centrifugação, separou-se a solução em três fases. Foram feitas duas purificações com a mistura de fenol e uma com clorofórmio (Merck Alpac). O protocolo continuou com a precipitação da fase superior aquosa com um carreador (glicogênio - Roche Diagnostic) e etanol absoluto (Merck Alpac) e finalizou-se com a eluição em Tris-EDTA (pH 8,0). A pureza do DNA foi avaliada pelo equipamento Nanodrop™ ND-1000 (Thermo Scientific) e a concentração pelo equipamento Qubit®, com o uso do reagente QUANT-IT dsDNA HS assay kit (Life Technologies).

### 3.5 SEQUENCIAMENTO DO ÉXON 3 DA BETACATENINA

Foi realizado o sequenciamento dos códons 41 e 45 do éxon 3 dos pacientes tratados cirurgicamente e que dispunham de material genético adequadamente extraído das amostras tumorais emblocadas em parafina.

O sequenciamento foi realizado utilizando a plataforma de sequenciamento de nova geração Ion Proton e a amplificação foi direcionada da região pelo método de sequenciamento-alvo (*target sequencing*).

Para isso, foi desenhado um par de *primers* que amplificassem a região de interesse, gerando um fragmento de 104 pares de bases. Após

reação em cadeia da polimerase (PCR), as amostras foram purificadas, utilizando *beads* magnéticas. Em seguida, foi feita a etapa de reparo das extremidades (*end repair*), em que foi acrescentado um grupo de fosfato às extremidades. As amostras são novamente purificadas, utilizando *beads* magnéticas.

O passo seguinte foi a ligação de adaptadores (P1 e A) e *barcodes* (junto do adaptador A). Os adaptadores direcionam as etapas de PCR em emulsão (ePCR) e o sequenciamento, enquanto que os *barcodes* são sequências únicas que permitem a identificação de cada amostra depois da corrida de sequenciamento. Após a ligação, foi feita nova purificação com *beads* magnéticas a fim de eliminar adaptadores e demais reagentes que não foram utilizados na reação.

Finalmente, realizou-se uma quantificação das bibliotecas de duas maneiras diferentes: por meio do Qubit® (Invitrogen, Thermo Fisher), equipamento que utiliza um fluoróforo que se liga especificamente à molécula de DNA dupla fita, permitindo uma quantificação mais precisa das bibliotecas, e por meio de qPCR, que utiliza sondas que se ligam especificamente aos adaptadores, possibilitando a diluição das amostras de forma equimolar para a ePCR.

A etapa de ePCR foi feita com o *kit* Ion PI™ Hi-Q™ OT2 200, a qual permitiu a amplificação clonal dos fragmentos das bibliotecas. Nesse momento, são formados as micelas, que possuem uma *bead* com sequência complementar a P1, e os reagentes necessários para amplificação dos fragmentos. Ocorre a entrada de um fragmento em cada micela e há sua amplificação clonal na superfície de cada *bead*. Por fim, tem-se a etapa de enriquecimento, em que apenas as *beads* com fragmentos de DNA amplificados foram selecionadas.

O produto final foi depositado em um *chip* com micropoços para dar início à etapa de sequenciamento, o qual foi feito utilizando o *kit* Ion PI™ Hi-Q™ Sequencing 200, juntamente com o Ion PI™ Chip Kit v3, que gerou em média 12 *gigabytes* (GB) de dados. O sequenciamento ocorreu de forma cíclica, com a liberação dos nucleotídeos em ordem conhecida. A

incorporação destes fez com que houvesse liberação de íon H<sup>+</sup> por ligação fosfodiéster, alterando o pH da reação, dando proporcionalidade ao número de bases incorporadas.

As sequências geradas foram comparadas com a sequência genômica de referência do gene *CTNNB1* (NG\_013302) para identificação das variantes com auxílio do *software* CLC Genomics Workbench. O critério de seleção para a chamada de variantes foi a cobertura mínima de 500 vezes e a frequência de pelo menos 1% da base alterada.

### 3.6 PAINEL DE 409 GENES

- **Preparo de biblioteca e sequenciamento NGS**

Os pacientes, cujos tumores não apresentavam mutação nos códons 41 e 45 do éxon 3 do gene *CTNNB1*, foram submetidos a um novo sequenciamento por meio de um painel de múltiplos genes, a fim de se identificar possíveis mutações em algum desses outros genes associados ou não à via Wnt. Utilizou-se um painel de 409 genes para analisar outras mutações localizadas em outros éxons do gene *CTNNB1* ou em outros genes ligados direta ou indiretamente à via Wnt/betacatenina, assim como em outros genes sem qualquer ligação com essa via de sinalização específica.

O preparo das bibliotecas de DNA para o sequenciamento de nova geração e as análises dos dados foram realizados pelo grupo do Laboratório de Genômica e Biologia Molecular do Centro Internacional de Pesquisa (CIPE) do A.C.Camargo Cancer Center, conduzidos pela Dra. Dirce Maria Carraro.

Para selecionar as amostras com um menor nível de degradação para a técnica de NGS, primeiramente fez-se uma PCR multiplex para que seis *amplicons* (de 112 a 204 pares de base) fossem amplificados e, assim, foi possível verificar se as amostras estariam ou não adequadas para o sequenciamento.

As amostras amplificadas foram tratadas com a enzima uracila-dna glicosilase (UDG) da Thermo Fisher Scientific (1 unidade/50 nanogramas (ng) com incubação de 15 minutos a 37 graus Celsius), para diminuir o número de variantes artefatuais resultante de transições C: G> T: A, no DNA de tecidos emblocados em blocos de parafina. O grupo recentemente demonstrou que o tratamento com a enzima UDG reduziu significativamente o número de artefatos de DNA por sequenciamento de próxima geração (NGS) e outros métodos (BERRA et al. 2019).

Após a seleção e tratamento das amostras, realizou-se a construção de bibliotecas com o Ion AmpliSeq™ Comprehensive Cancer Panel (Thermo Fisher Scientific), um painel comercial de 1.300 *kilobytes* (kB), que abrange 409 genes relacionados ao câncer, com 16 mil pares de *primers* distribuídos em quatro *pools*. O preparo das bibliotecas foi feito com o *kit* de reagentes Ion AmpliSeq™ *Library* 2.0, seguindo o protocolo Ion AmpliSeq *Library Preparation* (Thermo Fisher Scientific). Aproximadamente 10 nanogramas (ng) de DNA (quantificação realizada no Qubit Fluorometric Quantitation, Thermo Fisher Scientific) por *pool* de *primers*, totalizando aproximadamente 40 nanogramas de DNA de cada amostra. Os *amplicons* gerados foram tratados com a enzima FuPa, responsável pela digestão parcial dos *primers*. Em seguida, os adaptadores P1 e A, juntamente com *barcodes*, foram ligados aos *amplicons* por meio da enzima DNA Ligase e, posteriormente, foram purificados, utilizando *beads* magnéticas (Agencourt AMPure XP - Beckman Coulter).

Seguiu-se com a etapa de amplificação da biblioteca com reação de PCR em emulsão, utilizando o *kit* Ion PI™ Hi-Q™ OT2 200 (Thermo Fisher Scientific). Nessa etapa ocorre a amplificação clonal dos fragmentos no interior de milhares de micelas geradas nessa solução. O sequenciamento foi realizado com Ion PI™ Hi-Q™ *Sequencing* (Thermo Fisher Scientific), segundo as orientações do fabricante, e a reação foi depositada em um Ion PI™ Chip v3, possibilitando obter cerca de 10 *gigabytes* de dados.

O sequenciamento na plataforma Ion Torrent tem como base a liberação cíclica dos nucleotídeos em uma ordem conhecida, e a

incorporação de cada nucleotídeo na cadeia crescente por ligação fosfodiéster libera uma molécula de hidrogênio, modificando o pH da solução. A detecção de alterações no pH da solução a cada ciclo do sequenciamento permite a identificação da sequência de bases.

- **Chamada e seleção de variantes**

Os resultados do sequenciamento serão analisados no Torrent Suite *software*, pelo *plugin* Variant Caller (Ion Torrent – Life Technologies) e comparados com a versão do genoma GRCh37/HG19. Os arquivos V card (.vcf) foram importados para o *software* VarSeq (Golden Helix) para anotações adicionais e filtragem de variantes. Essas variantes identificadas foram filtradas de acordo com os seguintes critérios de qualidade e frequência: cobertura da base maior que 100, qualidade do genótipo maior que 50; base variante presente em pelo menos 5% das leituras; base variante presente em pelo menos duas leituras em cada sentido; número de bases iguais seguidas – região de homopolímero (HRUN) menor que 5; ausência da variante em bancos de dados populacionais (ExAC; NHLBI-ESP; 1000 Genomes) ou *minor allele frequency* (MAF) menor ou igual a 0,01. Ainda, com o objetivo de excluir possíveis variantes germinativas, foram retiradas as variantes com frequência entre 40% e 65% e descritas no banco de dados de polimorfismos de base única ou, em inglês, *single nucleotide polymorphism database* (dbSNP).

Posteriormente, as variantes foram selecionadas de acordo com seu efeito na proteína, sendo consideradas apenas: 1) variantes classificadas como perda de função (*loss of function* (LOF)) (variantes do tipo *frameshift*, ganho ou perda de códon de parada, alteração em sítio de *splice*) ou 2) variantes *missense* (deleção ou inserção *in frame*, troca de aminoácidos) preditas como possivelmente patogênicas em menos de três dos seis programas de predição utilizados (SIFT, PolyPhen, MutationTaster, Mutation Assessor, FATHMM, FATHMM MKL) e, também, em genes classificados como oncogenes ou genes supressores de tumor no banco de dados OncoMD.

A lista completa com todos os 409 genes, frequentemente mutados e associados com câncer (oncogenes e genes supressores de tumor) do *Comprehensive Cancer Panel* – Thermo Fisher, está disponível no Anexo 2.

### 3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Inicialmente, foi realizada uma análise descritiva das variáveis, em que, para as variáveis qualitativas, são apresentadas as distribuições de frequência absoluta (n) e relativa (%) e, para as variáveis quantitativas, são apresentadas as principais medidas-resumo, como média, desvio padrão, mediana e valores mínimo e máximo.

Para avaliar a associação entre as variáveis qualitativas, foi considerado o teste qui-quadrado ou o teste exato de Fisher, quando apropriado. A comparação das variáveis quantitativas (idade) em relação às variáveis de grupo (frequência alélica e mutação de proteína) foi realizada por meio de testes não paramétricos, como o teste U de Mann-Whitney para a comparação entre dois grupos, assim como o teste de Kruskal-Wallis para a comparação entre três ou mais grupos independentes.

A determinação de dois grupos de observações com respeito a um simples ponto de corte foi estimada utilizando a proposta de LAUSEN e SCHUMACHER (1992). Essa proposta visa obter o *melhor* valor de ponto de corte (*cut-off*) com o objetivo de *discriminar* as curvas de sobrevivência. A estimativa do *cut-off* é obtida por meio da maximização da estatística *log-rank* padronizada. Uma vez estimado o ponto de corte, a função de sobrevivência foi estimada utilizando o estimador de KAPLAN e MEIER (1958). As curvas de sobrevivência estimadas foram comparadas por meio do teste *log-rank*. Além disso, o modelo de riscos proporcionais de COX (COX 1972) foi ajustado aos dados para descrever a relação entre as variáveis independentes e o tempo até a recidiva. No modelo de Cox, todas as variáveis com valor de *p* inferior a 0,10 simples foram consideradas no modelo de Cox múltiplo. As variáveis do modelo de regressão de Cox múltiplo foram selecionadas a partir do método de *stepwise backward* com *p*

de entrada de 0,10, obtendo, assim, o modelo final. Em todos os modelos, foi avaliada a suposição de proporcionalidade por meio dos resíduos de SCHOENFELD (1982), GRAMBSCH e THERNEAU (1994). Em todos os casos, há evidências de que o efeito das covariáveis são constantes ao longo do tempo, justificando, assim, o uso do modelo de Cox.

A sobrevida livre de recaída ou recidiva (SLR) foi estimada tanto para os pacientes operados em nossa instituição, quanto para os operados inicialmente em outra instituição. Para tal análise, a variável tempo até a recidiva foi criada e calculada a partir da data da primeira cirurgia com intuito de ressecção completa até a data da confirmação da recidiva. Logo, as curvas e análises de sobrevivência relacionadas ao evento recidiva no local da doença foram realizadas apenas nos pacientes que possuíam essa informação de forma exata.

A associação do tipo de mutação dos códons 41 e 45 (sem mutação, mutação T41A, mutações S45F e S45P) com o evento recidiva local foi realizada em duas etapas. No primeiro momento, foram feitas a confecção de curvas de sobrevivência e as análises de sobrevida, considerando todos os pacientes que possuíam informação de margem, independentemente de a margem cirúrgica ser livre (R0) ou comprometida (R1 e R2); no segundo momento, com o objetivo de ter uma análise mais pura, os pacientes, cuja margem cirúrgica era sabidamente comprometida (R1 e R2), foram segregados e novas curvas e análises de sobrevida livre de recidiva foram elaboradas apenas para os pacientes com *status* de margem livre (R0), excluindo, assim, qualquer influência da margem sobre o evento de recidiva local.

O nível de significância adotado foi de 5%, ou seja, os resultados com valor de  $p$  inferior a 0,05 foram considerados significativos. A análise dos dados foi realizada por meio do *software* R versão 3.5 e do *software* SPSS versão 24.

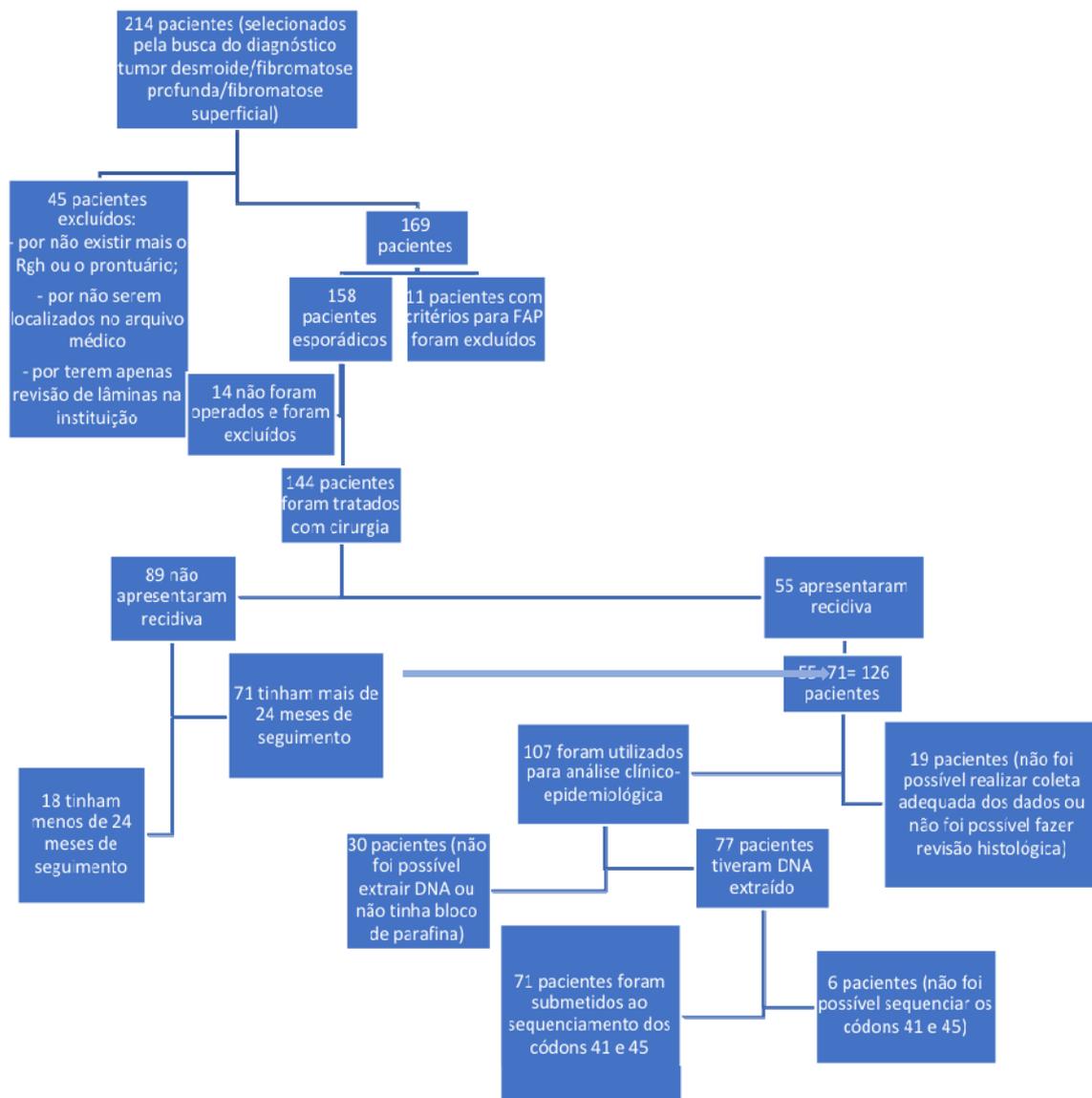
## 4 RESULTADOS

A busca pelo diagnóstico resultou na identificação de 214 pacientes com tumores desmoides no período de 35 anos. Quarenta e cinco pacientes foram excluídos por não mais existir o registro hospitalar ou o prontuário, por não ter sido encontrado o prontuário no setor de arquivo médico ou por ter sido realizada na instituição apenas uma revisão de lâminas no Setor de Patologia. Dessa forma, nossa amostra global inicial foi de 169 pacientes dos quais 158 foram considerados esporádicos e 11 apresentavam critérios para a adenomatose poliposa familiar (FAP) e foram excluídos.

Dos pacientes com doença esporádica 144 foram tratados com cirurgia. Destes, 55 casos apresentaram recidiva local e, em 89 pacientes, não foi observado recidiva. Todos os pacientes com recidiva foram incluídos em nossas análises, e os pacientes não recidivados com menos de 24 meses de seguimento, todavia, foram excluídos da amostra final, pois não cumpriam um dos critérios de inclusão. Sendo assim, houve uma amostra de 126 pacientes. Em 19 casos, a coleta dos dados não pôde ser adequadamente realizada ou a revisão histológica não pôde ser executada, por isso também foram excluídos.

A amostra final apresentou 107 pacientes, e seus dados foram utilizados para a realização das análises demográficas, clínicas e de tratamento. Conseguimos extrair DNA para realizar o sequenciamento de segunda geração dos códons 41 e 45 da betacatenina de 77 amostras. Logo, não conseguimos amostras de DNA de 30 espécimes, ora por não haver o bloco de parafina com quantidade suficiente para a realização da extração, ora por não conseguir a extração do DNA desses blocos por conta da má qualidade de conservação do bloco.

Todas as 77 amostras de DNA foram submetidas ao sequenciamento de segunda geração dos códons 41 e 45 do gene *CTNNB1*. Entretanto, não foi possível realizar um sequenciamento adequado em seis amostras. Sendo assim, a amostra final foi de 71 pacientes sequenciados.



**Figura 5** - Fluxograma da casuística

## 4.1 DADOS DEMOGRÁFICOS E CLÍNICOS

### 4.1.1 Gênero, idade e grupo étnico

A incidência foi maior em mulheres do que em homens. Dos 107 pacientes estudados, observou-se, na série, 63 (58,9%) mulheres e 44 (41,1%) homens (Tabela 1).

O paciente mais jovem tinha 8 meses ao diagnóstico e o mais velho 72 anos. A média de idade foi de 30,24 anos; a mediana, de 31, 32 anos; e o desvio padrão, de 15,89 anos.

**Tabela 1** - Frequência das variáveis clínicas e demográficas.

Variável	Categoria	N (107)	(%)
<b>Gênero</b>	Feminino	63	58,9
	Masculino	44	41,1
<b>Idade</b>	< 25 anos	35	32,7
	Entre 25 e 49	63	58,9
	Entre 50 e 75	9	8,4
<b>Grupos étnicos</b>	Branços	45	78,9
	Pardos	8	14
	Negros	2	3,5
	Amarelos	2	3,5
	Desconhecido	50	46,72
<b>Topografia 1</b>	Abdominal	32	29,9
	Não abdominal	75	70,1
<b>Topografia 2</b>	Extremidades	39	36,4
	Não extremidades	68	63,6
<b>Localização</b>	Intra-abdominal	11	10,3
	Parede abdominal	21	19,6
	Cabeça e pescoço	15	14
	Parede torácica/dorso	21	19,6
	Extremidades	39	36,4
<b>Tamanho do tumor</b>	< 5 cm	34	38,2
	[5 – 10) cm	34	38,2
	≥ 10 cm	21	23,6
	Desconhecido	18	16,8

Os pacientes foram categorizados em três grupos de acordo com a idade: grupo 1 entre 0 a 24 anos (32,7%), o grupo 2 entre de 25 a 49 anos (58,9%) e o grupo 3 entre 50 e 75 anos (8,4%). Os valores absolutos de cada grupo encontram-se descritos na Tabela 1.

Com relação aos grupos étnicos, foi possível avaliar apenas 57 dos 107 pacientes. E, de acordo com as descrições étnicas encontradas nos prontuários, os pacientes foram subdivididos em: brancos (45 pacientes), totalizando 78,9 % da amostra; pardos (oito pacientes), sendo 14% do total; negros (dois pacientes), totalizando 3,5% dos pacientes; e amarelos (dois pacientes), totalizando 3,5% da amostra.

#### **4.1.2 Topografia e localização**

Avaliou-se a localização dos tumores desmoides e constatou-se que 75 dos 107 pacientes, ou seja, 70,1% apresentavam tumores não abdominais e 32 dos 107 (29%) apresentavam lesões abdominais. Os pacientes foram agrupados em não extremidades e extremidades e foram observados 68 pacientes (63,6%) e 39 pacientes (36,4%), respectivamente, em cada grupo. Os pacientes também foram agrupados segundo as regiões/seguimentos do corpo e foi possível identificar que, em 39 casos (36,4%), os tumores estavam localizados nas extremidades; em 21 (19,6%), na parede torácica/dorso; em 21 (19,6%), na parede abdominal; em 15 (14%), na cabeça/pescoço; e em 11 (10,3%), no abdome, mas não foram localizados na parede abdominal. Vide Tabela 1.

#### **4.1.3 Tamanho**

Foi possível determinar o tamanho do tumor primário em 89 dos 107 pacientes e essas lesões variaram de 0,8 a 30 centímetros. A média em centímetros dos tumores foi de 7,25 centímetros; a mediana de 6,5 centímetros e o desvio padrão de 5,36 centímetros. A distribuição, seguindo a categorização adotada para o tamanho, que também se encontra na Tabela 1, foi a seguinte:

Grupo 1: tumores menores que 5 centímetros: 38,2% (34 espécimes).

Grupo 2: tumores maiores que 5 centímetros e menores que 10 centímetros: 38,2% (34 espécimes).

Grupo 3: tumores maiores que 10 centímetros: 23,6% (21 espécimes).

#### **4.1.4 Situação do paciente na admissão**

Dos 107 pacientes com tumor desmoide analisados, 58 (54,2%) foram admitidos sem qualquer tratamento e foram considerados pacientes intactos. A biópsia foi realizada antes da admissão em 18 (16,8%) indivíduos. Dezenove pacientes (17,8%) foram submetidos a um procedimento cirúrgico, e os outros 11,2% restantes foram submetidos à cirurgia e a algum outro tratamento complementar (tratamento sistêmico ou radioterapia), conforme descrito na Tabela 2. Entre os 27 pacientes cuja primeira cirurgia foi realizada em outra instituição, observou-se que 19 foram operados previamente apenas uma vez, antes de chegarem em nossa instituição, sete foram operados por duas vezes e dois pacientes foram submetidos a três cirurgias em outros serviços antes de chegarem ao centro.

#### **4.1.5 Tratamento**

A maioria dos pacientes (47,7%) foi submetida a um procedimento diagnóstico de biópsia previamente ao tratamento. Em 35 casos (32,7%), a biópsia não foi realizada antes da cirurgia, ou seja, os pacientes foram submetidos à cirurgia para ressecção do tumor, sem um diagnóstico histológico prévio. Em 21 pacientes, não foi possível obter informação sobre o *status* da biópsia (Tabela 2).

Todos os pacientes deste estudo foram submetidos ao tratamento cirúrgico. Em 89 pacientes (83,2%), evidenciou-se a cirurgia isolada para a ressecção das lesões como o principal tipo de tratamento realizado. A quimioterapia associada à cirurgia ocorreu em seis casos (5,6%). A radioterapia associada à cirurgia foi realizada em quatro pacientes (3,7% dos casos). A combinação de quimioterapia, radioterapia e cirurgia também ocorreu em quatro pacientes (3,7%). Em outros quatro pacientes, não foi

possível especificar a informação sobre a associação de tratamentos, por isso considerou-se como informação desconhecida, conforme descrito na Tabela 2.

Dos pacientes submetidos à cirurgia, 92 (95,8%) foram tratados com ressecção ampliada; três (3,1%) passaram por biópsia excisional e um indivíduo (1%) teve o membro amputado. Em 11 casos, não foi possível identificar exatamente qual o tipo de cirurgia havia sido realizado (Tabela 2).

A ressecção foi considerada adequada (margem livre) em 62 pacientes (57,9%). Trinta e três pacientes (30,8%) apresentavam margem comprometida após a cirurgia (comprometimento microscópico - R1 ou macroscópico - R2) e, em 12 pacientes (11,3%), não foi possível obter dados sobre o *status* de margem cirúrgica, ora por não haver informação no laudo do exame anatomopatológico, ora por não haver condições de revisão da margem no bloco de parafina, vide Tabela 2 a seguir.

**Tabela 2 -** Frequências das variáveis de tratamento.

<b>Variável</b>	<b>Categoria</b>	<b>N (107)</b>	<b>(%)</b>
<b>Situação do paciente na admissão</b>	Intacto	58	54,2
	Biopsiado	18	16,8
	Operado	19	17,8
	Quimioterapia	1	0,9
	Radioterapia	1	0,9
	Biopsiado e quimioterapia	1	0,9
	Operado e quimioterapia	2	1,9
	Operado e radioterapia	6	5,6
	Outros	1	0,9
<b>Número de cirurgias prévias à admissão</b>	0	66	64,7
	1	27	26,5
	2	7	6,9
	3	2	2,0
	Desconhecido	5	4,6
<b>Biópsia prévia</b>	Sim	51	47,7
	Não	35	32,7
	Desconhecido	21	19,6
<b>Tipo de tratamento na instituição final</b>	Cirurgia	89	83,2
	Cirurgia e quimioterapia	6	5,6
	Cirurgia e radioterapia	4	3,7
	Cirurgia, quimio e radio	4	3,7
	Desconhecido	4	3,7
<b>Tipo de tratamento categorizado</b>	Cirurgia	89	86,4
	Cirurgia combinada	14	13,6
	Desconhecido	4	3,7
<b>Tipo de cirurgia</b>	Ressecção ampla	92	95,8
	Amputação/desarticulação	1	1,0
	Biópsia excisional	3	3,1
	Desconhecido	11	10,2
<b>Margens cirúrgicas</b>	Livres	62	57,9
	Comprometidas	33	31,1
	Desconhecidas	12	11,3

## 4.2 DADOS DE SEGUIMENTO

O tempo médio transcorrido dos primeiros sinais e sintomas até a avaliação no A.C.Camargo Cancer Center foi de 17,30 meses. O tempo de seguimento variou de 7,30 a 337,20 meses, com um tempo médio de 134,33 meses e uma mediana de 105,6 meses.

No momento da última avaliação, 75 pacientes (70,1%) estavam vivos sem doença e 19 pacientes (17,8%) estavam vivos com doença. Tivemos dois casos (1,9%) de morte ligada à fibromatose agressiva, um caso (0,9%) de morte não ligada à fibromatose e oito casos (7,5%) que foram perdidos de vista, conforme descrito na Tabela 3.

**Tabela 3** - Situação clínica dos 107 pacientes portadores de tumores desmoides ao final da atualização dos dados.

Variável	Categoria	N	%
Situação clínica no último seguimento	Vivo sem doença	75	70,1
	Vivo com doença	19	17,8
	Vivo sem outra especificação	1	0,9
	Óbito pela doença	2	1,9
	Óbito sem a doença	1	0,9
	Óbito sem outra especificação	1	0,9
	Perdidos no seguimento	8	7,5
	Total	107	100,0

## 4.3 DADOS SOBRE OS PACIENTES COM RECIDIVA DO TUMOR

Todos os pacientes analisados por este estudo foram tratados de forma cirúrgica e, dos 107 casos revisados, 42 apresentaram recidiva da doença. Ou seja, foram evidenciados 39,3% de casos recidivados na casuística.

Dezessete pacientes (42,5%) tiveram apenas uma recidiva 14 (35%) tiveram duas, oito (20%) tiveram três e um indivíduo (2,5%) teve quatro episódios de recidiva após tratamento cirúrgico.

Oitenta e três por cento das recidivas ocorreram nos primeiros 24 meses após a primeira cirurgia. O tempo médio para ocorrência da recidiva foi de 25,5 meses e a mediana foi de 15,4 meses.

O menor espécime tumoral recidivado apresentava 2 centímetros de diâmetro e o maior apresentava 28 centímetros. O tamanho médio dos espécimes recidivados foi de 9,46 centímetros, o tamanho mediano foi de 6,9 centímetros e o desvio padrão de 6,79 centímetros.

O principal método isolado de tratamento das recidivas foi a cirurgia, totalizando 63,4% dos casos (26 de 41), seguido de quimioterapia com 14,6% (6 de 41) e radioterapia 4,9% (2 de 41). Três pacientes (7,3%) foram tratados com uma combinação de cirurgia e radioterapia, dois (4,9%) com cirurgia e quimioterapia, um (2,4%) com cirurgia, quimioterapia e radioterapia e um paciente (2,4%) teve um tratamento combinando cirurgia, quimioterapia e outro método que não a radioterapia.

Com relação às margens cirúrgicas, evidenciou-se que estavam livres de comprometimento em 44 casos não recidivados e em 18 casos recidivados e que estavam comprometidas em 21 casos não recidivados e em 12 recidivados. Sendo assim, conforme a Tabela 4 pode demonstrar, não há indícios de associação entre as variáveis margens e recidiva, ou seja, há evidências de independência entre essas variáveis.

**Tabela 4** - Tabulação cruzada: margens (livres e comprometidas) x *status* de recidiva (não e sim).

Variável	Categoria	Recidiva		Total	Valor p	
		Não	Sim			
<b>Margem</b>	Livres	N	44	18	62	0,617
		%	67,7%	60,0%		
	Comprometidas	N	21	12	33	
		%	32,3%	40,0%	34,7%	
<b>Total</b>	N	65	30	95		
	%	100,0%	100,0%	100,0%		

#### 4.4 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

O sequenciamento dos códons 41 e 45 das 71 amostras emblocadas em parafina foi realizado com sucesso. Obteve-se cobertura mínima de 500 vezes e utilizou-se a frequência da base alterada de 1% como *cut-off* para considerar a variante como verdadeira. Os dados completos do sequenciamento estão tabulados na Tabela 5.

A cobertura total média de leituras foi de 165.761,78 vezes, e a cobertura média das variantes foi de 30.076,09 vezes.

**Tabela 5** - Caracterização das alterações moleculares e das mutações nos códons 41 e 45 do gene da betacatenina dos 71 casos estudados.

Amostra	Alteração cDNA	Alteração Proteína	Cobertura Total	Cobertura Referência	Cobertura Variante	Frequência Alélica (VAF) (%)	Tipo de Mutação
Desm 1T	c.121A>G	p.Thr41Ala	182978	151188	26455	14,5	Códon 41
Desm 1T	c.134C>T	p.Ser45Phe	178057	165112	5903	3,3	Códon 45
Desm 2T	c.133T>C	p.Ser45Pro	305517	179578	125877	41,2	Códon 45
Desm 3T	c.121A>G	p.Thr41Ala	37894	31422	5566	14,7	Códon 41
Desm 4T	c.134C>T	p.Ser45Phe	401006	234981	91281	22,8	Códon 45
Desm 5T	c.134C>T	p.Ser45Phe	148191	142249	4188	2,83	Códon 45
Desm 6T	c.133T>C	p.Ser45Pro	544083	320634	223386	41,1	Códon 45
Desm 7T	c.134C>T	p.Ser45Phe	414100	346467	28952	7	Códon 45
Desm 8T	c.134C>T	p.Ser45Phe	369661	276742	38957	10,5	Códon 45
Desm 9T	c.121A>G	p.Thr41Ala	281657	249324	20941	7,4	Códon 41
Desm 10T	c.134C>T	p.Ser45Phe	334656	208582	57470	17,2	Códon 45
Desm 11T			15907				Sem alteração
Desm 12T	c.121A>G	p.Thr41Ala	225674	159680	56249	24,9	Códon 41
Desm 13T	c.134C>T	p.Ser45Phe	9008	3596	5033	55,9	Códon 45
Desm 14T	c.134C>T	p.Ser45Phe	49504	35445	10856	21,9	Códon 45
Desm 15T	c.134C>T	p.Ser45Phe	70356	46561	15422	21,9	Códon 45
Desm 16T	c.134C>T	p.Ser45Phe	78285	58933	14142	18,1	Códon 45
Desm 17T			117383				Sem alteração
Desm 18T	c.121A>G	p.Thr41Ala	270818	184446	70108	25,9	Códon 41
Desm 19T	c.134C>T	p.Ser45Phe	217539	203318	10919	5	Códon 45
Desm 20T	c.134C>T	p.Ser45Phe	416360	346633	42774	10,3	Códon 45
Desm 21T	c.121A>G	p.Thr41Ala	398501	252534	122335	30,7	Códon 41
Desm 22T			148212				Sem alteração
Desm 23T	c.121A>G	p.Thr41Ala	388076	223567	51184	13,2	Códon 41
Desm 24T	c.121A>G	p.Thr41Ala	345323	359333	12727	3,7	Códon 41

Cont/ Tabela 5

Amostra	Alteração cDNA	Alteração Proteína	Cobertura Total	Cobertura Referência	Cobertura Variante	Frequência Alélica (VAF) (%)	Tipo de Mutação
Desm 25T	c.134C>T	p.Ser45Phe	612709	522233	65698	10,7	Códon 45
Desm 26T	c.121A>G	p.Thr41Ala	496914	278577	189410	38,1	Códon 41
Desm 27T	c.134C>T	p.Ser45Phe	274504	203143	48651	17,7	Códon 45
Desm 28T	c.121A>G	p.Thr41Ala	351	335	12	3,42	Códon 41
Desm 28T	c.134C>T	p.Ser45Phe	349	248	94	26,93	Códon 45
Desm 29T	c.121A>G	p.Thr41Ala	484260	325011	130222	26,9	Códon 41
Desm 30T	c.134C>T	p.Ser45Phe	129185	90457	22790	17,6	Códon 45
Desm 31T	c.121A>G	p.Thr41Ala	186203	141957	34070	18,3	Códon 41
Desm 32T	c.121A>G	p.Thr41Ala	280895	184792	81805	29,1	Códon 41
Desm 33T	c.121A>G	p.Thr41Ala	122764	103302	17040	13,9	Códon 41
Desm 34T			47738				Sem alteração
Desm 35T	c.121A>G	p.Thr41Ala	10418	8880	1239	11,89	Códon 41
Desm 36T	c.121A>G	p.Thr41Ala	103338	83011	18845	18,24	Códon 41
Desm 37T	c.121A>G	p.Thr41Ala	25154	22148	2344	9,32	Códon 41
Desm 38T	c.121A>G	p.Thr41Ala	18990	15068	2851	15,01	Códon 41
Desm 39T	c.134C>T	p.Ser45Phe	20863	15314	2862	13,72	Códon 45
Desm 40T			34615				Sem alteração
Desm 41T	c.133T>C	p.Ser45Pro	20376	13261	7113	34,91	Códon 45
Desm 42T	c.121A>G	p.Thr41Ala	55584	41308	10604	19,08	Códon 41
Desm 43T	c.121A>G	p.Thr41Ala	14620	9320	4393	30,05	Códon 41
Desm 44T	c.121A>G	p.Thr41Ala	37320	33463	2919	7,82	Códon 41
Desm 45T	c.121A>G	p.Thr41Ala	9518	6217	2758	28,98	Códon 41
Desm 45T	c.134C>T	p.Ser45Phe	8973	8659	168	1,87	Códon 45
Desm 46T	c.121A>G	p.Thr41Ala	15852	10255	4270	26,94	Códon 41
Desm 47T	c.121A>G	p.Thr41Ala	207567	162977	37872	18,25	Códon 41

Cont/ Tabela 5

Amostra	Alteração cDNA	Alteração Proteína	Cobertura Total	Cobertura Referência	Cobertura Variante	Frequência Alélica (VAF) (%)	Tipo de Mutação
Desm 48T	c.121A>G	p.Thr41Ala	559596	526231	26247	4,69	Códon 41
Desm 49T	c.134C>T	p.Ser45Phe	10625	8096	1144	10,77	Códon 45
Desm 50T	c.121A>G	p.Thr41Ala	60350	50589	7193	11,92	Códon 41
Desm 51T	c.133T>C	p.Ser45Pro	45477	35835	9623	21,16	Códon 45
Desm 52T			8355				Sem alteração
Desm 53T	c.121A>G	p.Thr41Ala	42800	26543	12092	28,25	Códon 41
Desm 54T	c.121A>G	p.Thr41Ala	107960	80001	21943	20,33	Códon 41
Desm 55T			192571				Sem alteração
Desm 56T	c.121A>G	p.Thr41Ala	123531	116477	5792	4,69	Códon 41
Desm 56T	c.133T>C	p.Ser45Pro	121607	119478	2119	1,74	Códon 45
Desm 57T	c.121A>G	p.Thr41Ala	122273	80853	34853	28,5	Códon 41
Desm 58T	c.121A>G	p.Thr41Ala	107201	68840	29231	27,27	Códon 41
Desm 59T	c.121A>G	p.Thr41Ala	218829	189752	20307	9,28	Códon 41
Desm 60T	c.121A>G	p.Thr41Ala	90809	59402	24531	27,01	Códon 41
Desm 61T	c.121A>G	p.Thr41Ala	96747	84826	9441	9,76	Códon 41
Desm 62T	c.121A>G	p.Thr41Ala	160179	152639	5730	3,58	Códon 41
Desm 63T	c.121A>G	p.Thr41Ala	190361	177233	9826	5,16	Códon 41
Desm 64T	c.133T>C	p.Ser45Pro	128761	117269	11484	8,92	Códon 45
Desm 65T	c.121A>G	p.Thr41Ala	234089	198929	28333	12,1	Códon 41
Desm 65T	c.134C>T	p.Ser45Phe	227097	215526	6077	2,68	Códon 45
Desm 66T	c.121A>G	p.Thr41Ala	173534	161878	9310	5,36	Códon 41
Desm 66T	c.134C>T	p.Ser45Phe	173200	169659	2222	1,28	Códon 45
Desm 67T			72717				Sem alteração
Desm 68T	c.121A>G	p.Thr41Ala	103793	100160	2890	2,78	Códon 41
Desm 69T	c.134C>T	p.Ser45Phe	67946	53971	5955	8,76	Códon 45
Desm 70T			105346				Sem alteração
Desm 71T			50097				Sem alteração

Desse modo, considerando o critério de 1% para a seleção de variantes, observou-se que dez amostras das 71 analisadas (14,1%) não apresentavam qualquer mutação nos códons avaliados, e nos outros 61 espécimes (85,9%) havia mutação nos códons 41 ou 45 no gene codificante da betacatenina. Dessas amostras, 90,2% (55 de 61) apresentavam somente uma mutação (códon 41 ou códon 45) e 10,8% (6 de 61) apresentavam duas mutações, sendo elas no códon 41 (T41A) e no 45 (S45F ou S45P), vide Tabela 6.

Sendo assim, foram evidenciados, em 33 casos de 71 analisados (46,5%): a mutação p.Thr41Ala (T41A ou 41A); em 16 casos (22,5%), a mutação p.Ser45Phe (S45F ou 45F); em seis (8,5%), a mutação p.Ser45Pro (S45P ou 45P); em cinco (7%), as mutações T41A e S45F e, em apenas um caso (1,4%), a mutação T41A e S45P.

**Tabela 6** - Distribuição das mutações por subgrupos categorizados.

<b>Categoria</b>	<b>N (71)</b>	<b>(%)</b>
<b>Sem mutação</b>	10	14,1
<b>Alguma mutação</b>	61	85,9
<b>Sem mutação</b>	10	14,1
<b>Uma mutação</b>	55	77,5
<b>Duas mutações</b>	6	8,4
<b>Sem mutação</b>	10	14,1
<b>Mutação T41A</b>	33	46,5
<b>Mutação S45F</b>	16	22,5
<b>Mutação S45P</b>	6	8,5
<b>Mutação T41A e S45F</b>	5	7,0
<b>Mutação T41A e S45P</b>	1	1,4
<b>Sem mutação</b>	10	14,1
<b>Mutação T41A</b>	33	46,5
<b>Mutação S45F e S45P</b>	22	30,9
<b>Mutação T41A e S45F ou S45P</b>	6	8,4
<b>Mutação S45F</b>	16	22,5
<b>Caso contrário</b>	55	77,5

A menor fração de alelo variante (VAF) foi de 1,28% e a maior de 55,87%; a média da VAF foi de 16,54.

Optou-se, também, por categorizar a variável frequência alélica em três grupos, de acordo com a porcentagem apresentada, ou seja, pacientes com menos de 10%, pacientes com mais de 10% e menos do que 20% e pacientes com mais de 20% de fração de alelo variante. Dessa forma, foram observados 18 21 e 22 casos para cada grupo respectivamente ordenado. Esses dados se encontram descritos na Tabela 7.

**Tabela 7** - Distribuição da fração do alelo variante por subgrupos categorizados.

<b>Categoria</b>	<b>N (61)</b>	<b>(%)</b>
<b>Frequência alélica &lt;= 10%</b>	18	29,5
<b>Frequência alélica (10% – 20%]</b>	21	34,4
<b>Frequência alélica &gt; 20%</b>	22	36,1
<b>Frequência alélica &lt;= 10%</b>	18	29,5
<b>Frequência alélica &gt; 10%</b>	43	70,5

A distribuição das mutações em relação a gênero, idade e localização foi avaliada e observou-se que não existe uma diferença significativa na distribuição das mutações, de acordo com essas variáveis (Tabela 8). A relação dessas variáveis com a frequência alélica foi analisada e não há relação entre elas, conforme descrito na Tabela 9.

**Tabela 8** - Associação entre gênero, idade e localização com o tipo de mutação encontrado no sequenciamento dos códons 41 e 45 do gene *CTNNB1*.

Variável	Categoria		Tipo de mutação						Total	Valor <i>p</i>
			Sem mutação	41	41 e 45F	41 e 45P	45F	45P		
Gênero	M	n	5	12	10	4	0	0	31	0,087
		%	50,0%	36,4%	62,5%	66,7%	0,0%	0,0%	43,7%	
	F	n	5	21	6	2	5	1	40	
		%	50,0%	63,6%	37,5%	33,3%	100,0%	100,0%	56,3%	
Idade	< 25	n	4	7	1	1	7	3	23	0,199
		%	40,0%	21,2%	20,0%	100,0%	43,8%	50,0%	32,4%	
	[25-50)	n	4	24	3	0	9	3	43	
		%	40,0%	72,7%	60,0%	0,0%	56,3%	50,0%	60,6%	
	[50-75)	n	2	2	1	0	0	0	5	
		%	20,0%	6,1%	20,0%	0,0%	0,0%	0,0%	7,0%	
Localização	Abdome não parede abdominal	n	1	7	0	0	1	0	9	0,685
		%	10,0%	21,2%	0,0%	0,0%	6,3%	0,0%	12,7%	
	Parede abdominal	n	2	7	1	1	1	1	13	
		%	20,0%	21,2%	20,0%	100,0%	6,3%	16,7%	18,3%	
	Cabeça e pescoço	n	3	3	1	0	2	1	10	
		%	30,0%	9,1%	20,0%	0,0%	12,5%	16,7%	14,1%	
	Parede torácica/dorso	n	0	7	1	0	4	1	13	
		%	0,0%	21,2%	20,0%	0,0%	25,0%	16,7%	18,3%	
	Extremidades	n	4	9	2	0	8	3	26	
		%	40,0%	27,3%	40,0%	0,0%	50,0%	50,0%	36,6%	
Topografia 2	Não extremidades	n	6	24	3	1	8	3	45	0,598
		%	60,0%	72,7%	60,0%	100,0%	50,0%	50,0%	63,4%	
	Extremidades	n	4	9	2	0	8	3	26	
		%	40,0%	27,3%	40,0%	0,0%	50,0%	50,0%	36,6%	

**Tabela 9** - Associação entre gênero, idade e localização com a frequência alélica categorizada em menor ou igual a 10%, entre 10% e 20% e maior que 20%.

Variável	Categoria	Frequência alélica			Total	Valor <i>p</i>	
		≤10	(10-20]	>20			
<b>Sexo</b>	M	n	6	11	9	0,477	
		%	33,3%	52,4%	40,9%		42,6%
	F	n	12	10	13		35
		%	66,7%	47,6%	59,1%		57,4%
<b>Idade</b>	<25	n	6	9	4	0,220	
		%	33,3%	42,9%	18,2%		31,1%
	[25-50)	n	10	12	17		39
		%	55,6%	57,1%	77,3%		63,9%
	[50-75)	n	2	0	1		3
		%	11,1%	0,0%	4,5%		4,9%
<b>Localização</b>	Abdome não parede abdominal	n	1	4	3	0,859	
		%	5,6%	19,0%	13,6%		13,1%
	Parede abdominal	n	4	3	4		11
		%	22,2%	14,3%	18,2%		18,0%
	Cabeça e pescoço	n	3	3	1		7
		%	16,7%	14,3%	4,5%		11,5%
	Parede torácica/dorso	n	4	3	6		13
		%	22,2%	14,3%	27,3%		21,3%
Extremidades	n	6	8	8	22		
	%	33,3%	38,1%	36,4%	36,1%		
<b>Topografia 2</b>	Não extremidades	n	12	13	14	0,953	
		%	66,7%	61,9%	63,6%		63,9%
	Extremidades	n	6	8	8		22
		%	33,3%	38,1%	36,4%		36,1%

## 4.5 PAINEL DE 409 GENES

Avaliou-se, em seguida, a qualidade das informações do prontuário dos 10 pacientes, cuja análise não mostrou qualquer alteração nos códons 41 e 45 do éxon 3 do gene *CTNNB1*, bem como a possibilidade de extrair mais amostras de DNA dos blocos de parafina e, então, foi analisado o painel de 409 genes (Apêndice 2).

Por ser um painel grande (1.3 *kilobytes*) e pelo fato de a qualidade do DNA de amostras antigas embocadas em parafina poder ser não satisfatória, realizou-se uma reação de controle de qualidade (reação de PCR com seis pares de *primers*) para verificar previamente se o DNA era passível de amplificação, utilizando um par de *primer* capaz de gerar fragmentos de 112 a 204 pares de bases. Nessa etapa, apenas quatro amostras de DNA se apresentaram aptas para amplificar os fragmentos e com perfil desejado.

O painel de 409 genes nas quatro amostras foi preparado, entretanto, para uma delas, o perfil da biblioteca não foi o esperado, indicando que a biblioteca não teria qualidade suficiente para análise de sequenciamento. Sendo assim, não se realizou o sequenciamento dessa amostra, ficando, então, com três amostras para sequenciar.

A corrida de sequenciamento ficou razoável. Foram obtidos 6.2 *gigabytes* de dados, 60.890.410 sequências, porém as amostras apresentaram baixa cobertura (cobertura média de 315 vezes). Realizou-se, então, nova corrida de sequenciamento, mas o resultado foi semelhante, o que indicou que o DNA não apresentou qualidade suficiente para o sequenciamento, tampouco para a análise dos genes do painel.

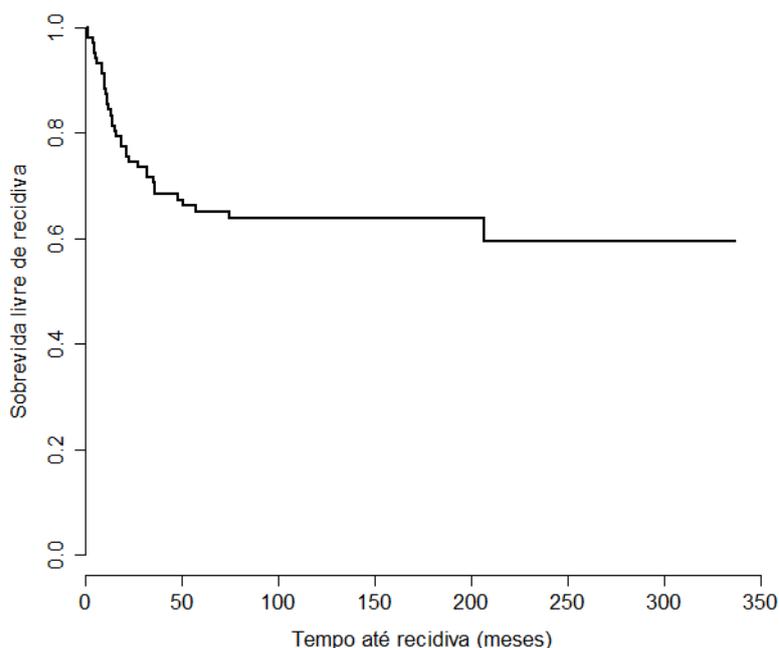
Mesmo com baixa cobertura, em uma análise visual foram avaliadas as sequências dos genes *CTNNB1* (outras regiões além do éxon 3) e *APC*. Em uma das amostras (Desm 52T), foi encontrada uma deleção de cinco bases no gene *APC* (c.7698\_7702delAACTG, p.Thr2567Lysfs\*14), com cobertura da região de 1.027 vezes, e frequência alélica de 81%. No entanto, não foi possível realizar nenhuma análise mais profunda nos

demais genes do painel, visto que a cobertura baixa em amostras emblocadas em parafina tornaria a confiabilidade das variantes selecionadas baixa, com maior possibilidade de serem artefatuais resultados de erros de sequenciamento.

#### **4.6 ANÁLISE DA SOBREVIDA LIVRE DE RECIDIVA LOCAL**

Para essa análise, foram estudados todos os pacientes que apresentavam o tempo decorrido da data da primeira cirurgia, seja ela realizada em nossa instituição, seja em outro centro, até o evento recidiva local. Neste presente estudo, não se observou influência da margem no evento recidiva e, portanto, não houve segregação dos pacientes que apresentavam algum comprometimento de margem das análises de sobrevivência. Todavia, para fins de confirmação da associação do tipo de mutação com o evento recidiva, realizou-se, também, uma análise considerando apenas aqueles pacientes cujo *status* de margem cirúrgica era livre de comprometimento.

A taxa de sobrevida livre de recidiva (SLR) foi, então, determinada para 102 pacientes, uma vez que, em cinco deles, não foi possível determinar o tempo exato entre a cirurgia e a recorrência local. Sendo assim, constatou-se uma SLR de 74,5% em 2 anos, de 65,1% em 5 anos, de 63,7% em 10 anos e de 59,5% em 20 anos. Logo, a probabilidade de se ter uma recidiva em até 2, 5 10 e 20 anos seria de 25,5%, 34,9%, 36,3% e 40,5%, respectivamente (Figura 6 e Tabela 10).



**Figura 6** - Curva atuarial de sobrevida livre de recidiva (SLR) para 102 pacientes portadores de tumor desmoide esporádico submetidos a tratamento cirúrgico.

**Tabela 10** - Sobrevida livre de recidiva em 2, 5 10 e 20 anos com seu respectivo erro padrão.

Tempo	Estimativa de sobrevida livre de recidiva	Erro padrão
24 meses	0,745	0,043
60 meses	0,651	0,048
120 meses	0,637	0,049
240 meses	0,595	0,061

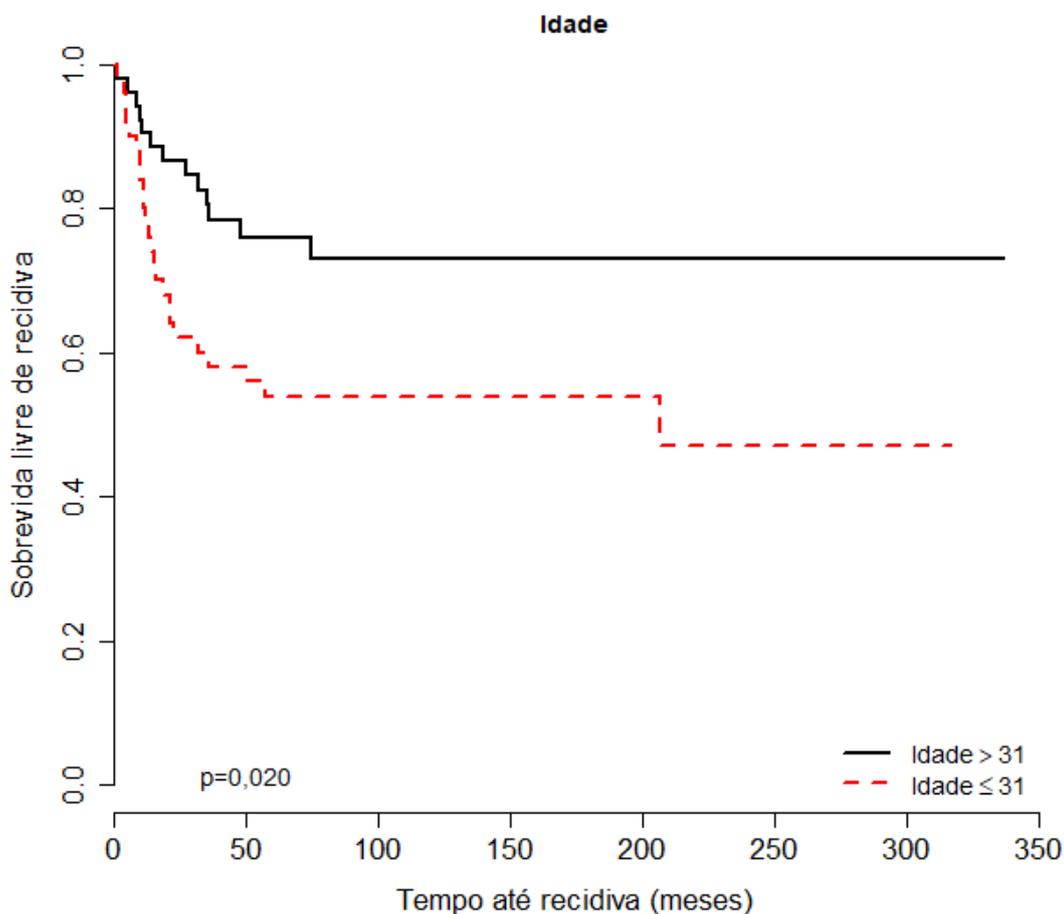
Foram analisadas também quais das variáveis, entre clínicas/demográficas e moleculares, influenciaram na sobrevida livre de recidiva. As variáveis gênero, idade estratificada (menor que 25 anos, entre 25 e 50 anos e maior que 50 anos), topografia 1 (abdominal *versus* não abdominal), biópsia prévia, tipo de cirurgia, número de alterações moleculares e tipo de mutação (sem mutação *versus* alguma mutação) foram submetidas à análise de sobrevivência, por meio das curvas de

Kaplan-Meier e teste de *log-rank*, no entanto, não apresentaram diferença significativa entre as curvas. Sendo assim, optou-se por não as anexar ao corpo deste texto. Todavia, essas variáveis, bem como suas análises, se encontram descritas na Tabela 11.

As variáveis idade, tamanho do tumor, localização, topografia 2, número de cirurgias prévias, tipo de tratamento e tipo de mutação associaram-se significativamente com o evento recidiva e foram descritas uma a uma, assim como suas respectivas curvas de sobrevivência e seus testes de *log-rank*. O resumo desses dados e seus respectivos valores de sobrevida em dois, cinco e dez anos está resumido na Tabela 11.

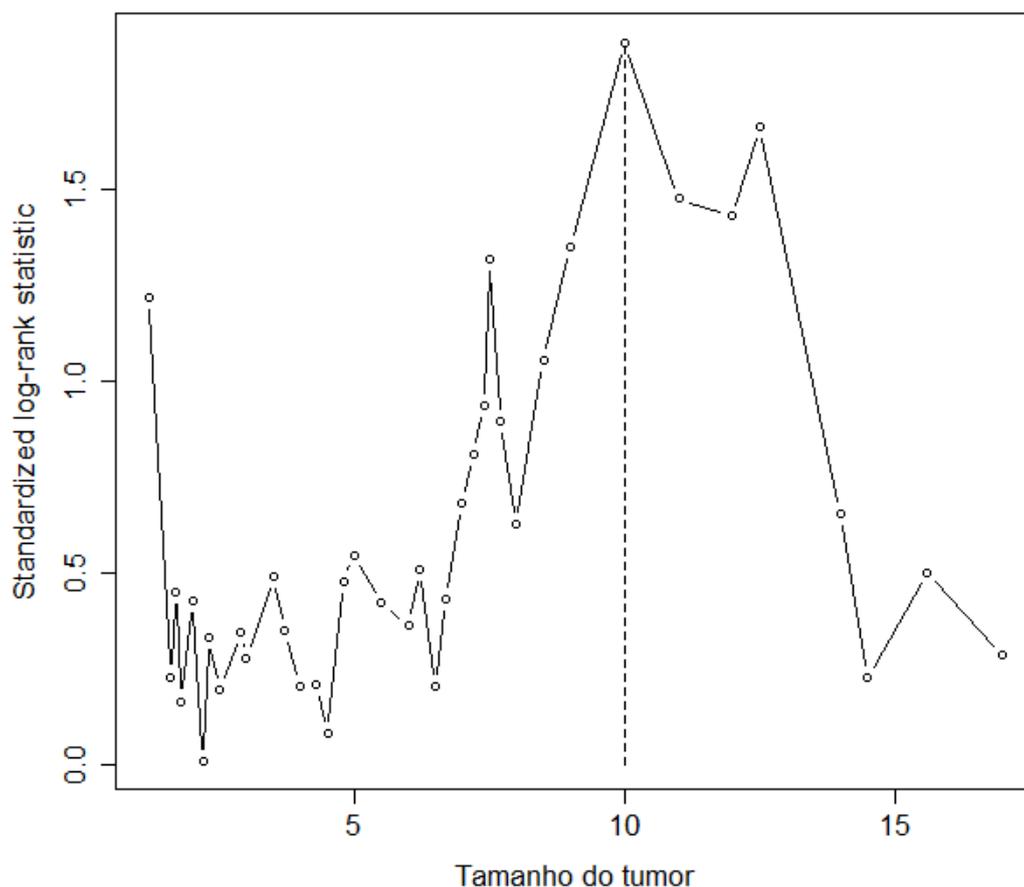
A variável frequência alélica e margens cirúrgicas, apesar de não ter sido estatisticamente significativa em relação ao evento recidiva, também está descrita no texto a seguir.

Na Figura 7, há a estimativa da curva de sobrevivência estratificada pela variável idade (com a técnica de LAUSEN e SCHUMACHER (1992) para obtenção de um ponto de corte). Por meio do teste *log-rank* (valor  $p = 0,020$ ), há indícios de que as curvas de sobrevivência não são iguais em relação à variável idade, e a idade menor ou igual a 31 anos apresentou uma menor sobrevida livre de recidiva.



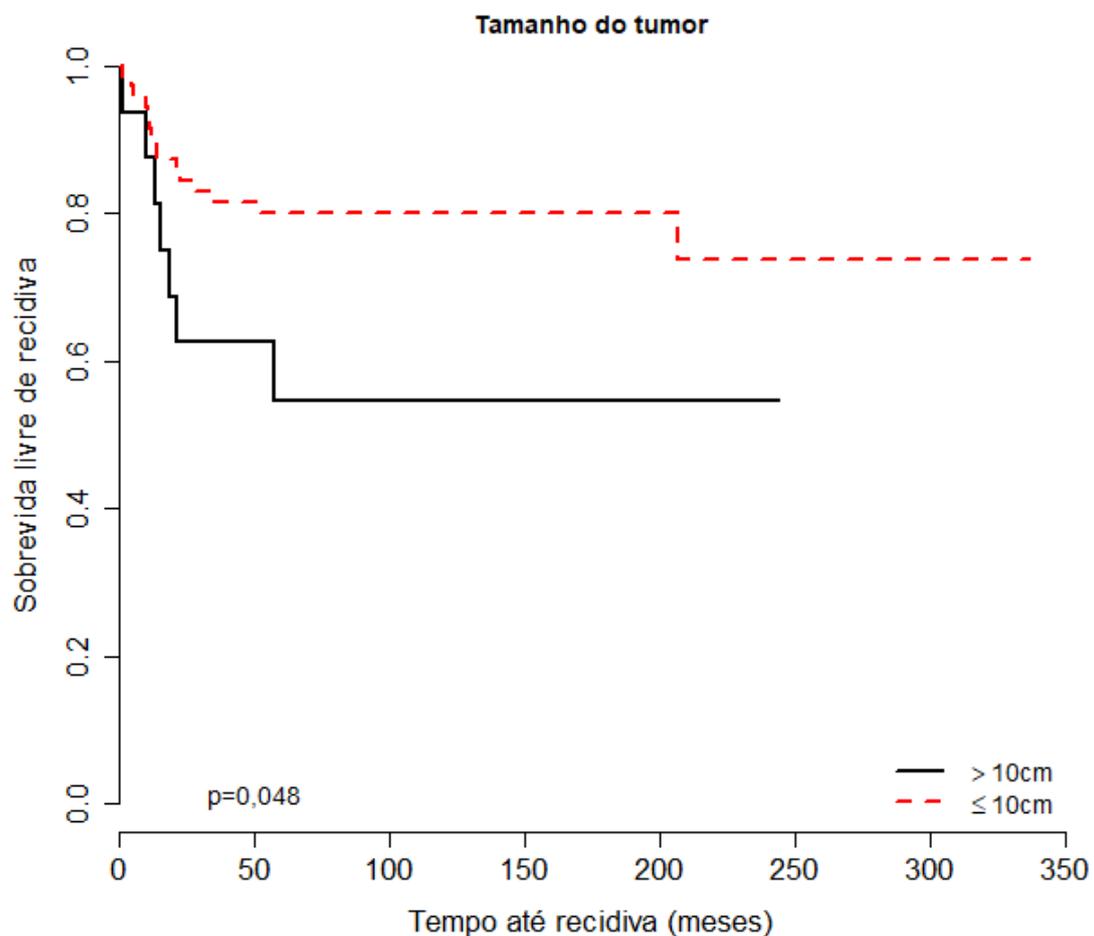
**Figura 7** - Curva atuarial de sobrevida livre de recidiva para 102 pacientes portadores de tumor desmoide, de acordo com a variável idade (52 pacientes maiores do que o *cut-off* de 31 e 50 anos com idade igual ou menor que 31 anos).

Foi avaliado se o tamanho do tumor influenciava na sobrevida livre de recidiva. Dividiu-se essa variável em duas categorizações para o tamanho do tumor, sendo elas o tamanho obtido via *cut-off* (Figura 8) e o tamanho segundo a clássica divisão de estadiamento para tumores de partes moles (tumores menores que 5 centímetros, entre 5 e 10 centímetros, maiores que 10 centímetros).

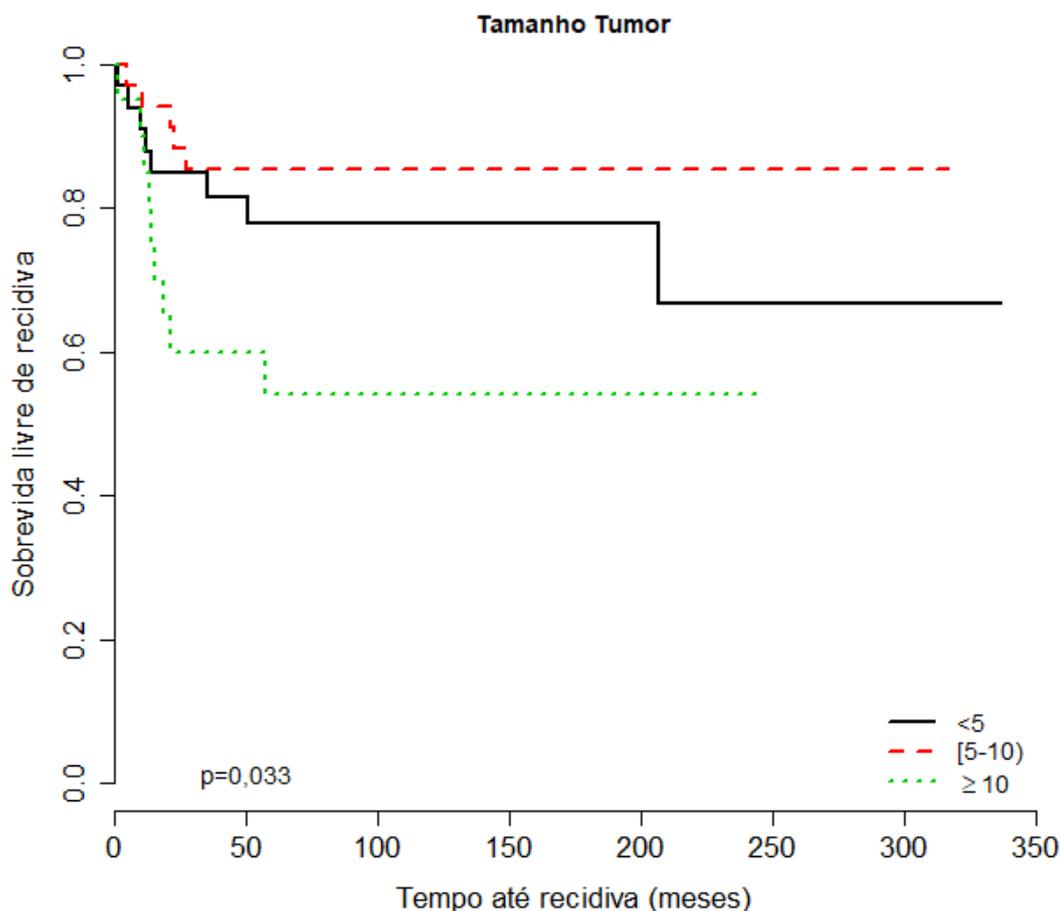


**Figura 8** - Estimativa do ponto de corte para a variável tamanho do tumor em relação à recidiva da doença.

Por meio da Figura 9, é possível observar uma divergência entre as duas curvas, sinalizando uma diferença significativa ( $p = 0,048$ ) entre elas e demonstrando uma menor sobrevida livre de recidiva nos pacientes com tumores maiores do que 10 centímetros. O mesmo ocorre quando comparamos os pacientes com tumores maiores do que 10 centímetros em relação aos pacientes com tumores menores do que 5 centímetros e entre 5 e 10 centímetros, valor  $p = 0,033$ .

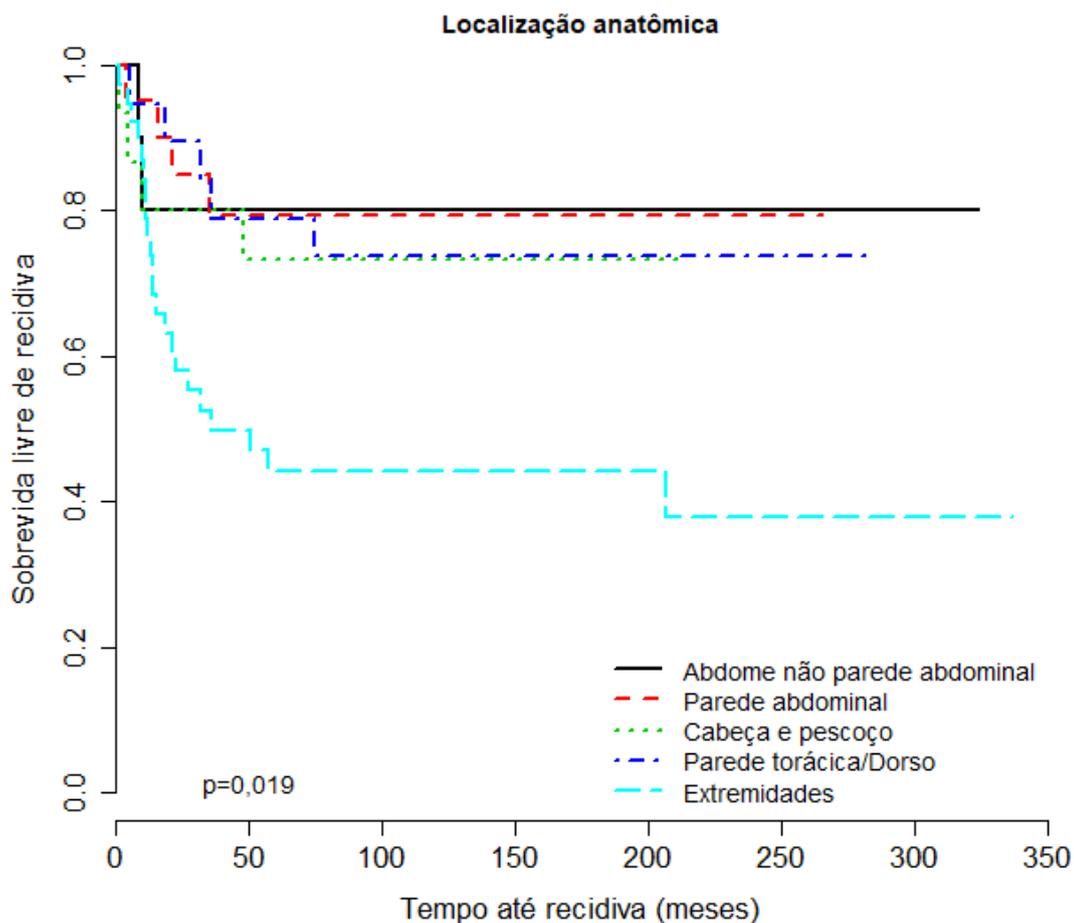


**Figura 9** - Curva atuarial de sobrevida livre de recidiva para 87 pacientes portadores de tumor desmoide, de acordo com o tamanho do tumor (71 pacientes com tamanho menor ou igual ao *cut-off* de 10 centímetros e 16 pacientes com tamanho maior que 10 centímetros).



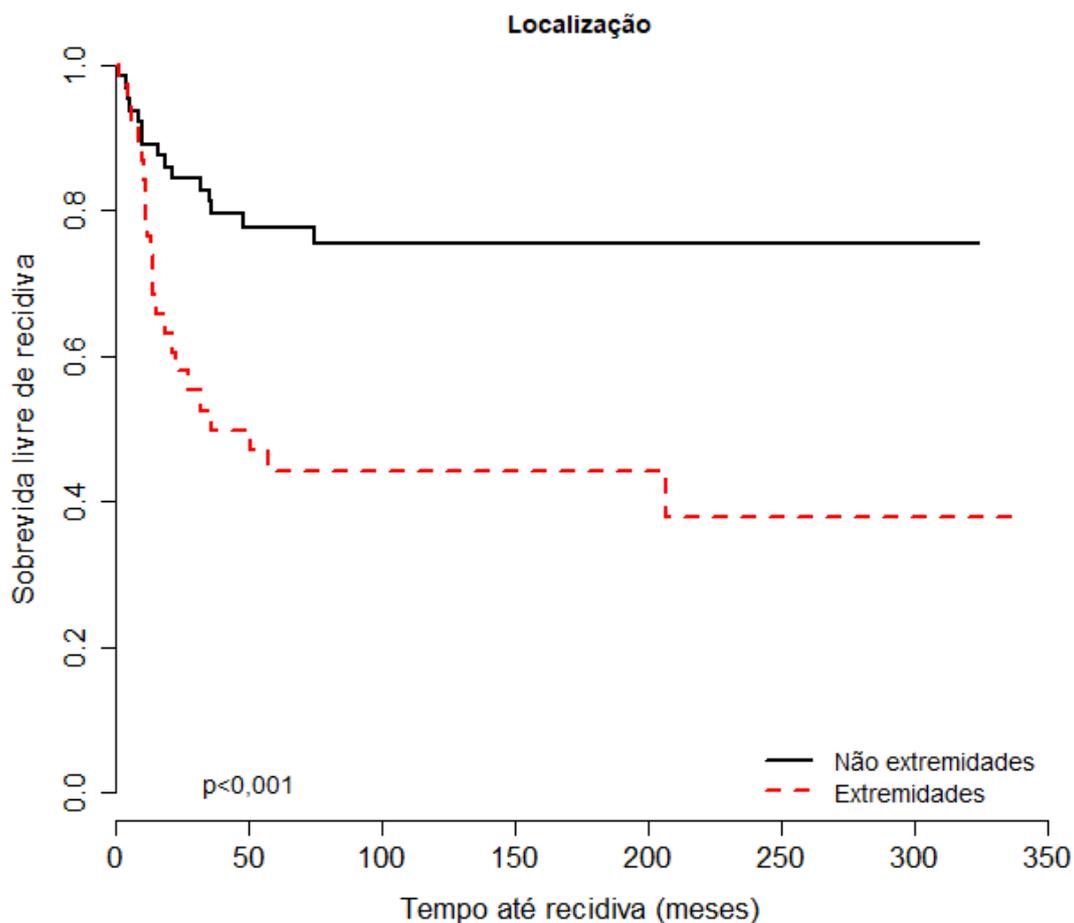
**Figura 10** - Curva atuarial de sobrevida livre de recidiva para 87 pacientes portadores de tumor desmoide, de acordo com a variável tamanho do tumor “T”, conforme categorizada pelo estadiamento TNM (33 pacientes com tamanho menor que 5 centímetros; 34, entre 5 e 10 centímetros; e 20, maior ou igual a 10 centímetros).

As curvas de sobrevida livre de recidiva também se mostraram estatisticamente diferentes em relação à localização. Para tal análise, foi utilizada a variável localização subdividida em abdome não parede abdominal, parede abdominal, cabeça e pescoço, parede torácica/dorso e extremidades. A Figura 11 mostra a estimativa da curva de sobrevivência estratificada pela variável localização, bem como o valor  $p = 0,019$  associado ao teste de *log-rank*.



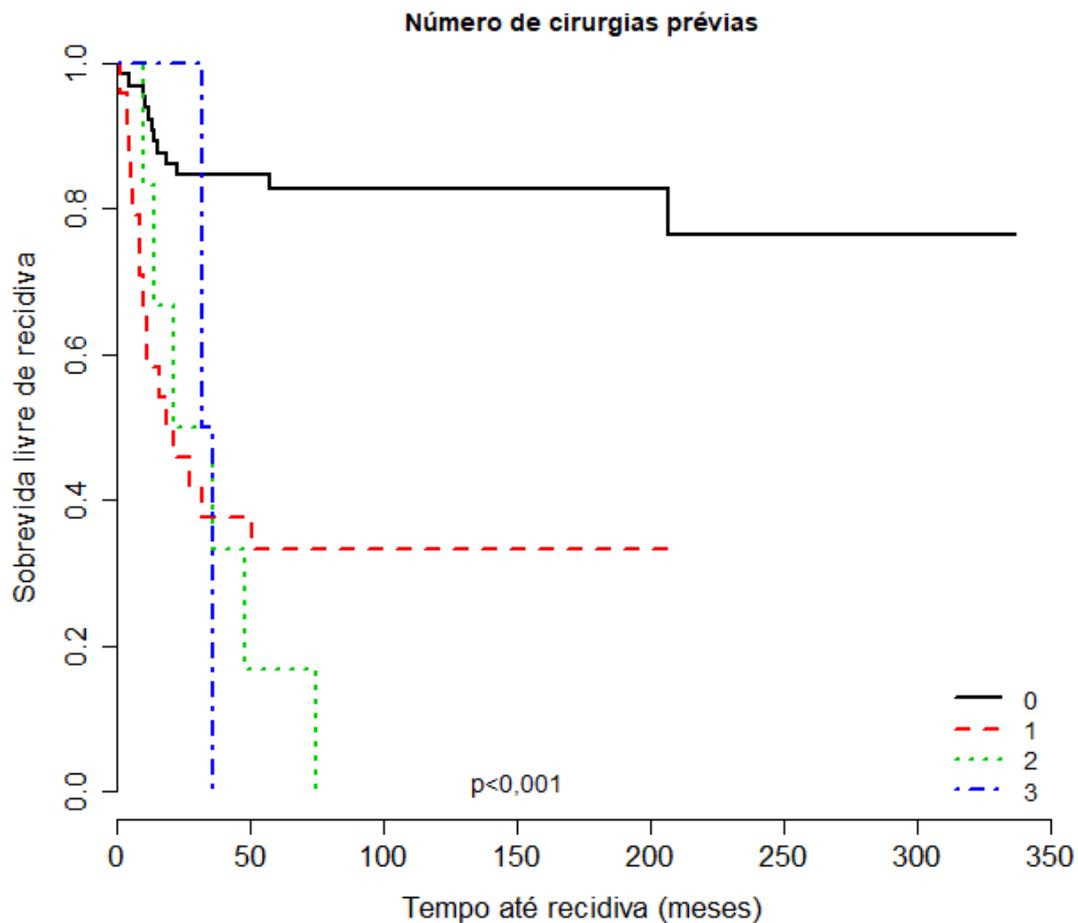
**Figura 11** - Curva atuarial de sobrevida livre de recidiva para 102 pacientes portadores de tumor desmoide, de acordo com a localização (10 casos, no abdome não parede abdominal; 20, na parede abdominal; 15, na cabeça/pescoço; 19, na parede torácica/dorso; e 38, nas extremidades).

Ao utilizar a variável topografia 2 (não extremidades *versus* extremidades) para a construção de curvas de sobrevivência livre de recorrência também se observou uma clara divergência entre as curvas desses dois grupos com um valor  $p < 0,001$ , demonstrando, assim, uma pior SLR do grupo extremidades em relação ao grupo não extremidades (Figura 12).



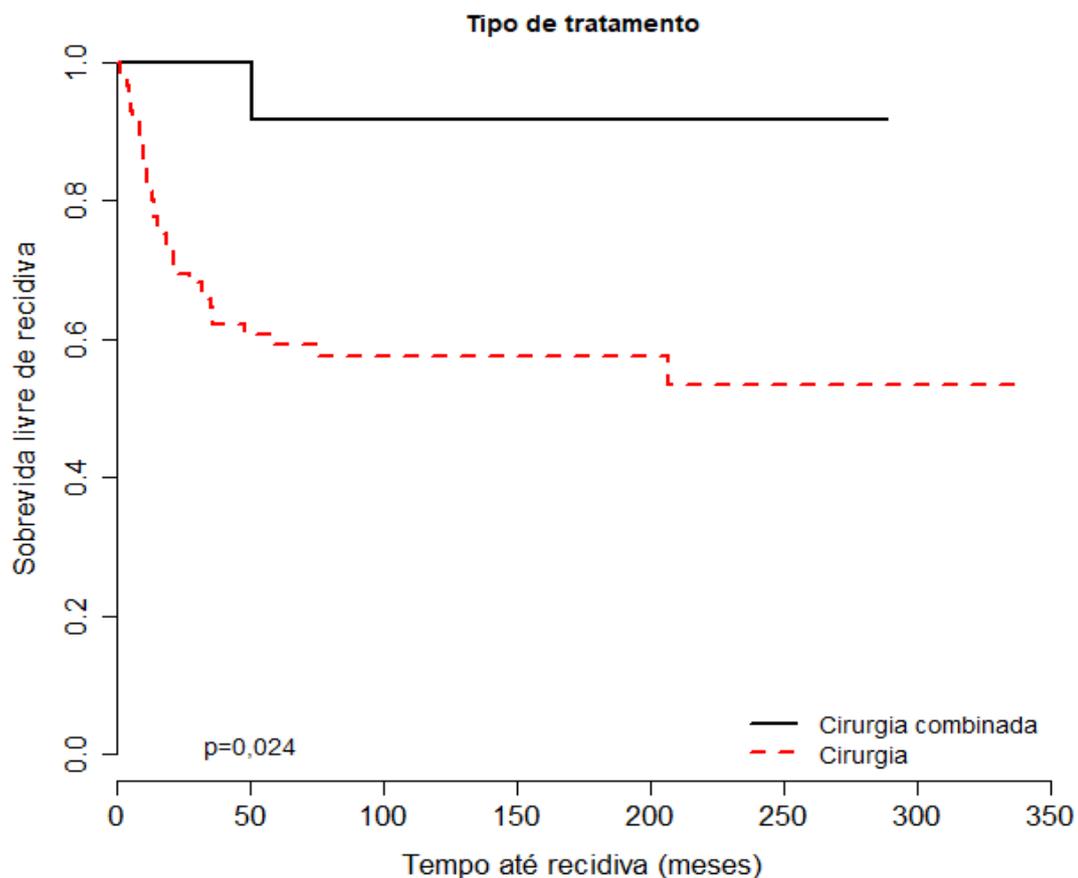
**Figura 12** - Curva atuarial de sobrevida livre de recidiva para 102 pacientes portadores de tumor desmoide, de acordo com a variável topografia 2 (64 não extremidades e 38 localizados nas extremidades).

A Figura 13 mostra a estimativa da curva de sobrevivência estratificada pela variável número de cirurgias prévias. O cálculo do tempo para a recidiva refere-se à primeira recidiva, caso tenha ocorrido. E a cirurgia prévia refere-se aos tratamentos realizados previamente à admissão no A.C.Camargo Cancer Center. Por meio do teste *log-rank* (valor  $p < 0,001$ ), temos indícios de que as curvas de sobrevivência são diferentes em relação ao número de cirurgias prévias, de forma que os pacientes operados previamente em outro serviço tiveram uma curva de sobrevida livre de recidiva pior do que os que chegaram intactos à instituição.



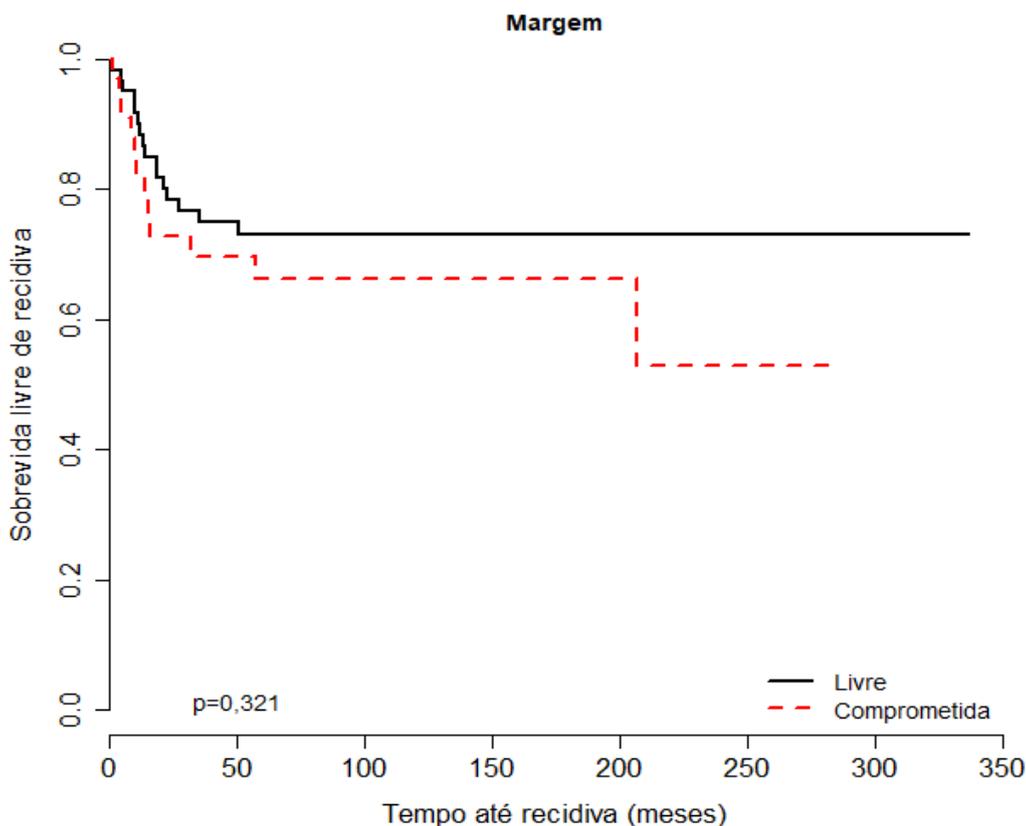
**Figura 13** - Curva atuarial de sobrevivência para 97 pacientes portadores de tumor desmoide, de acordo com a variável número de cirurgias prévias à admissão (nenhuma cirurgia (n = 65), uma cirurgia (n = 24), duas cirurgias (n = 6), três cirurgias (n = 2)).

Em relação ao tipo de tratamento, observou-se, na Figura 14, uma diferença entre as curvas de sobrevida para o evento recidiva entre os pacientes submetidos apenas à cirurgia em relação àqueles submetidos ao tratamento cirúrgico combinado com quimioterapia, radioterapia ou ambos, valor  $p = 0,024$ , o que confirma uma pior sobrevida dos pacientes, submetidos apenas ao tratamento cirúrgico.



**Figura 14** - Curva atuarial de sobrevida livre de recidiva para 98 pacientes portadores de tumor desmoide, de acordo com o tipo de tratamento (85 pacientes submetidos apenas à cirurgia e 13 submetidos à cirurgia combinada com algum outro tratamento).

Analizou-se, também, a influência das margens na sobrevida livre de recidiva e foi observado, pelas curvas de sobrevivência, que não há diferença entre as curvas dos pacientes com margem cirúrgica livre e as daqueles com margem cirúrgica comprometida. A Figura 15 demonstra esses achados e o respectivo valor  $p = 0,321$ .

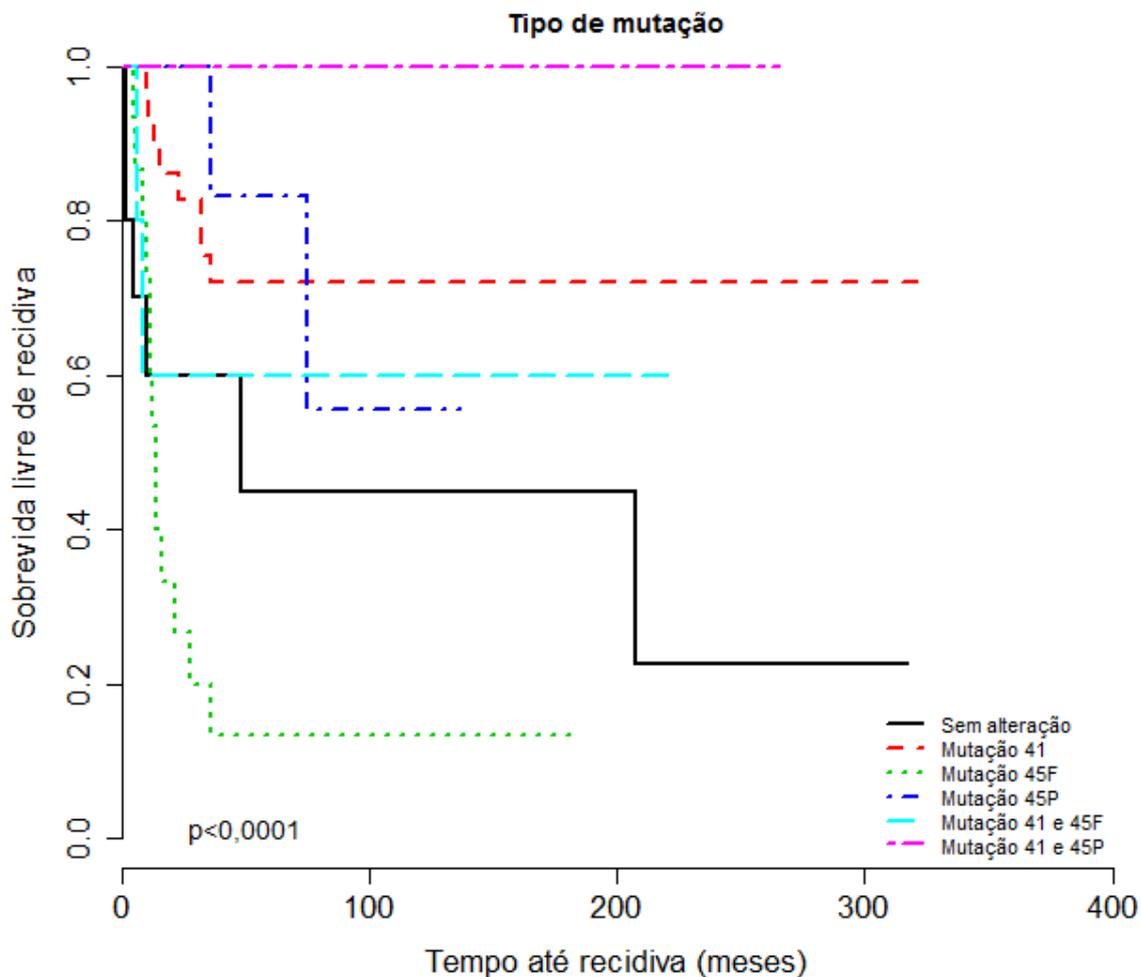


**Figura 15** – Curva atuarial de sobrevida livre de recidiva para 93 pacientes, de acordo com as margens cirúrgicas (60 pacientes com margens livres e 33 com margens comprometidas).

#### 4.7 ANÁLISE DA SOBREVIDA LIVRE DE RECIDIVA DE ACORDO COM AS VARIÁVEIS MOLECULARES

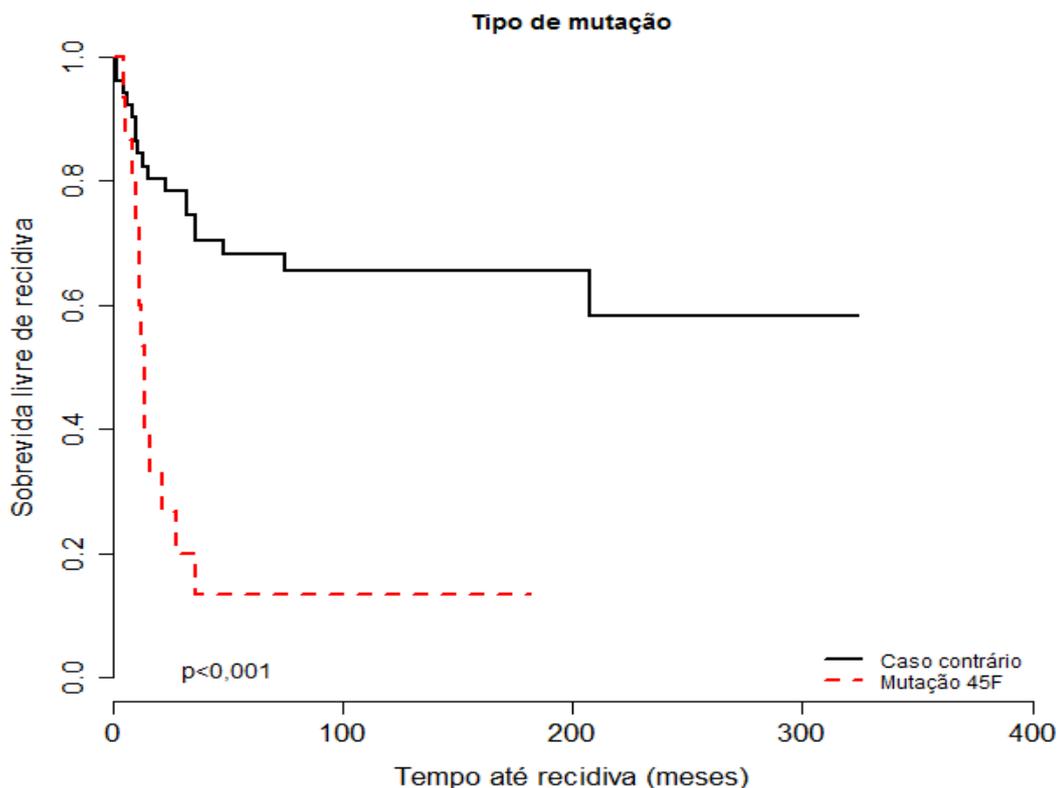
Dos 71 pacientes submetidos ao sequenciamento dos códons 41 e 45 do éxon 3 do gene codificante da betacatenina, cinco tinham o tempo, até a recidiva, indeterminado e foram excluídos dessa análise. Logo, a análise da sobrevida livre de recidiva, de acordo com o *status* mutacional foi realizada para 66 pacientes.

Na Figura 16, evidenciamos a existência de uma diferença estatisticamente significativa entre as curvas, de acordo com o tipo específico de mutação ( $p < 0,0001$ ) e foi possível perceber que os pacientes com a mutação S45F são os que apresentam a pior curva de sobrevida.



**Figura 16** - Curva atuarial de sobrevida livre de recidiva para 66 pacientes, de acordo com o *status* de mutação dos pacientes (10 pacientes sem mutação 29 com mutação T41A 15 com S45F, 6 com S45P, 5 com T41A e S45F e 1 com T41A e S45F).

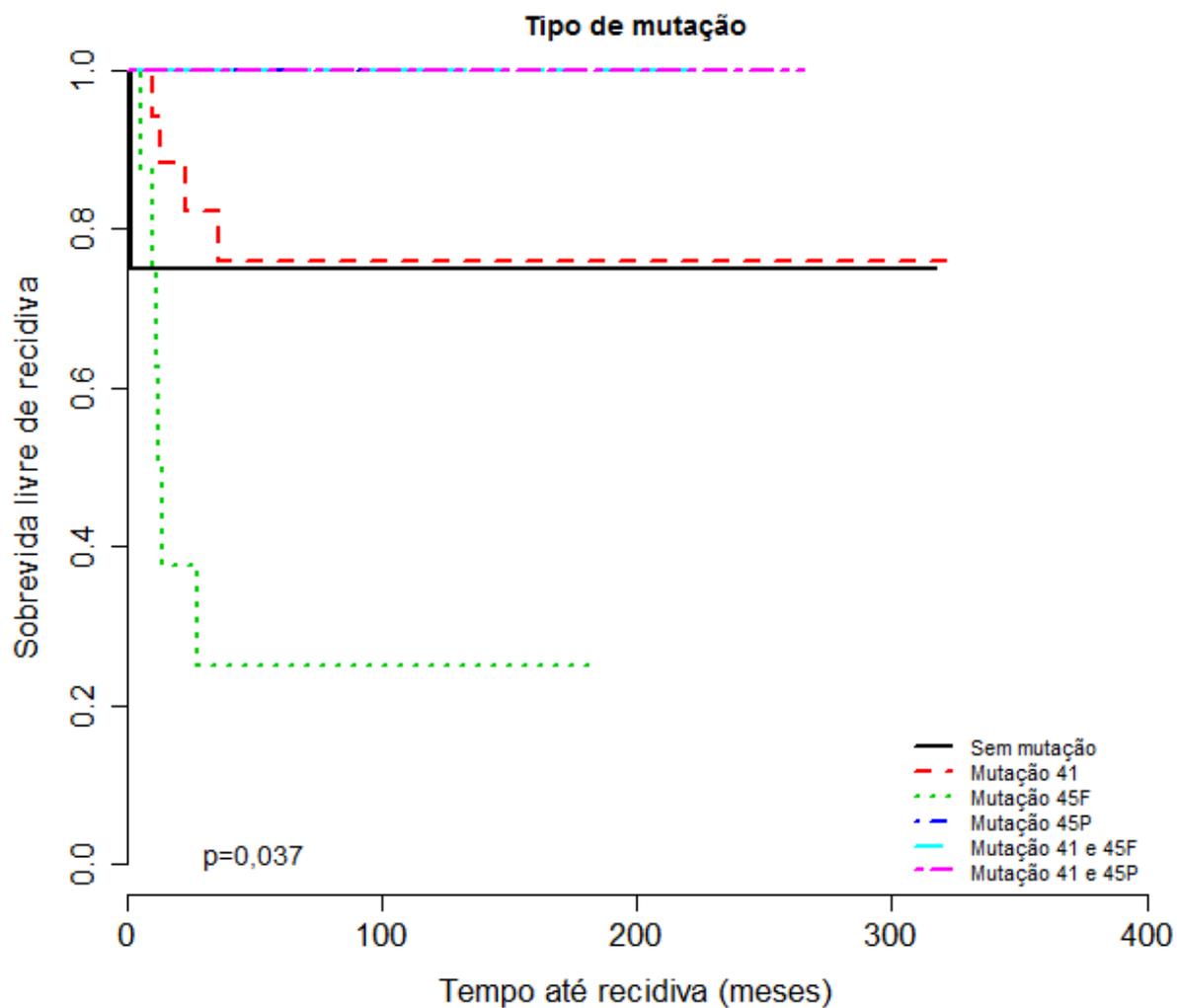
Sendo assim, objetivando melhor estudar essa diferença estabeleceu-se um agrupamento e, em um grupo, foram colocados os pacientes com mutação S45F e, no outro grupo, os pacientes não mutados e aqueles com mutações não S45F (caso contrário).



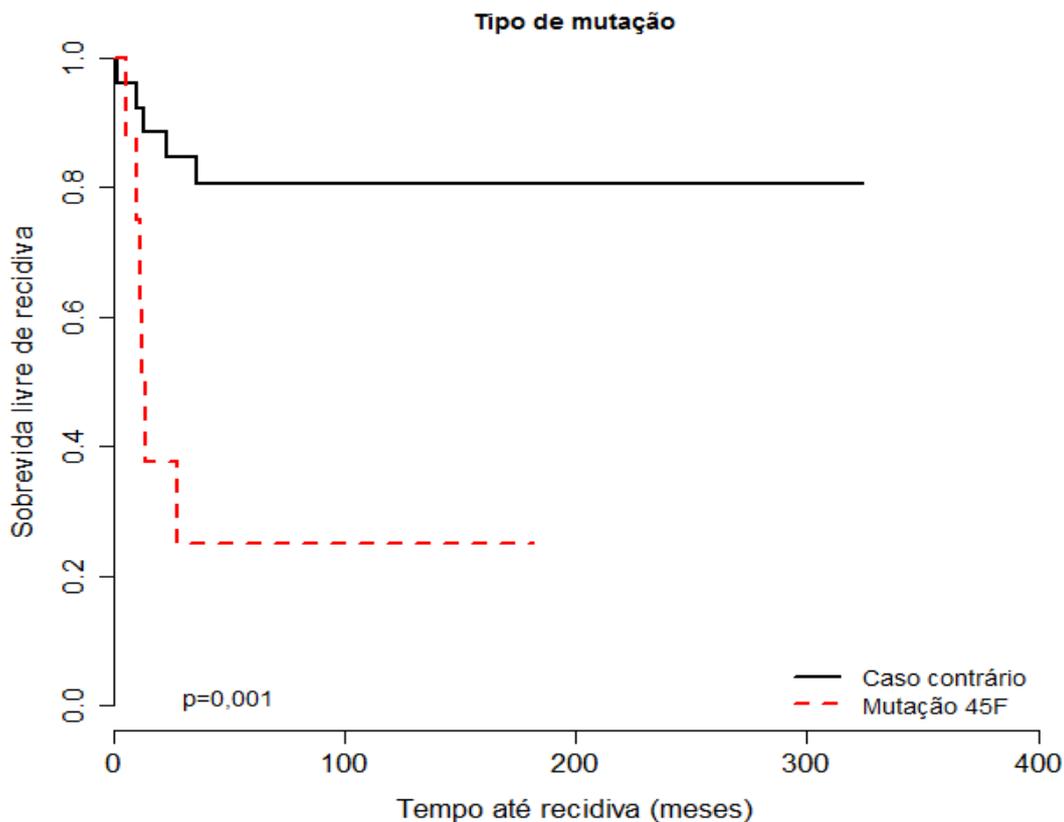
**Figura 17** - Curva atuarial de sobrevida livre de recidiva para 66 pacientes, de acordo com o tipo de mutação (15 com mutação S45F *versus* 51 com outras mutações ou não mutados).

Avaliando essa última curva de Kaplan-Meier (Figura 17), observou-se que as curvas realmente não são iguais ( $p < 0,001$ ). Logo, a sobrevida livre de recidiva dos pacientes com mutação S45F em dois, cinco e dez anos foi, respectivamente, de 26,7%, 13,3% e 13,3%, isto é, muito menor que a dos demais (caso contrário) 78,4%, 68,1% e 65,4% (Tabela 11).

Entretanto, essas análises foram realizadas para a amostra global, ou seja, sem segregar os pacientes que apresentavam margem cirúrgica comprometida. Então, a fim de excluir o fator comprometimento de margem, foi proposta uma outra análise para as curvas de sobrevida estratificada pelo tipo de mutação e, para esse novo estudo, fez-se uma análise de sobrevida livre de recidiva para um grupo restrito de 34 pacientes que apresentavam margens cirúrgicas livres, correlacionando com o *status* mutacional (Figuras 18 e 19).



**Figura 18** - Curva atuarial de sobrevida livre de recidiva para 34 pacientes, de acordo com o *status* de mutação dos pacientes (4 sem mutação 17 com mutação T41A, 8 com mutação S45F 2 S45P 2 com T41A e S45F e 1 com T41A).

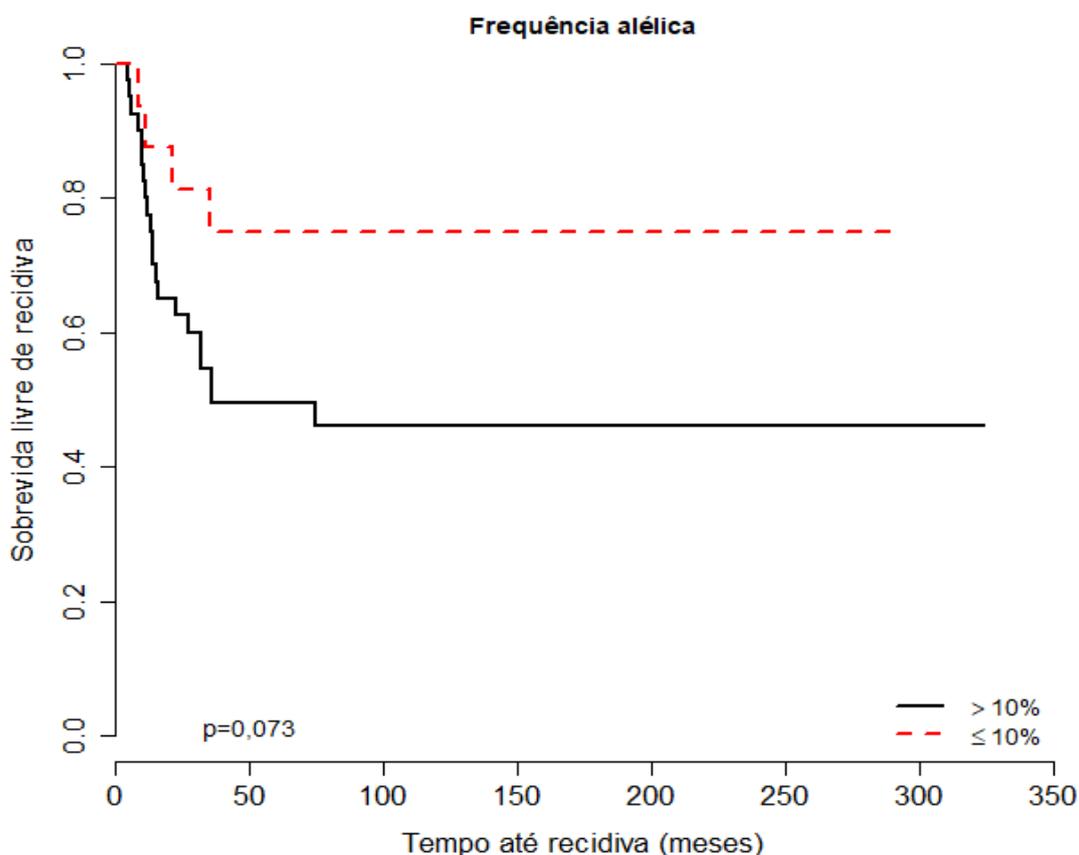


**Figura 19** - Curva atuarial de sobrevida livre de recidiva para 34 pacientes, de acordo com o *status* de mutação, apenas para pacientes com margens livres.

Ao analisar as curvas de sobrevivência anteriormente mencionadas (Figuras 18 e 19), observou-se, novamente, uma diferença entre as curvas. Ou seja, nas duas curvas os pacientes com mutação S45F têm uma sobrevida livre de recidiva pior que os demais pacientes. E, na última curva (Figura 19), observou-se que essa diferença ocorre, em última análise, entre o grupo de pacientes com mutação S45F em relação aos demais ( $p = 0,001$ ). Como é possível observar na Tabela 11, a sobrevida livre de recidiva dos pacientes com mutação S45F em dois, cinco e dez anos foi, respectivamente, de 37,5% 25% e 25%, ou seja, muito menor que a dos demais (caso contrário) 84,6%, 80,6% e 80,6%.

Realizou-se, ainda, uma análise para verificar se a frequência alélica ou a fração de alelo variante (obtida pelo *cut-off* = 10%) influenciou no evento recorrência local. Foram excluídos dez pacientes que não

apresentavam mutação, e a análise final foi feita com 56 pacientes. A estimativa da curva de sobrevivência estratificada pela variável frequência alélica (Figura 20) estabelece uma tendência distinta entre as duas curvas. Os pacientes com frequência alélica maior do que 10% tiveram uma sobrevida pior do que os pacientes com menos de 10% de frequência alélica. Contudo, o valor  $p$  foi de 0,073, muito próximo da significância, porém, ao considerar a significância de 5%, ele não é significativo.



**Figura 20** – Curva de sobrevida livre de recidiva para 56 pacientes, de acordo com a variável frequência alélica (*cut-off*) ou fração de alelo variante (16 espécimes com menos de 10% e 40 espécimes com VAF igual ou maior que 10%).

**Tabela 11** - Sobrevida livre de recidiva em até dois, cinco e dez anos, de acordo com as variáveis demográficas, clínicas e moleculares de pacientes portadores de tumor desmoide.

Variável	Categoria	n	Recidiva	Probabilidade de não ocorrer recidiva em			Valor p
				2 anos	5 anos	10 anos	
<b>Idade</b>	>31 anos	52	13	0,865	0,761	0,731	<b>0,02</b>
	≤31 anos	50	24	0,620	0,539	0,539	
<b>Idade</b>	<25	35	15	0,657	0,569	0,569	0,603
	[25-50)	58	19	0,793	0,704	0,679	
	[50-75)	9	3	0,778	0,622	0,622	
<b>Sexo</b>	M	41	19	0,732	0,554	0,521	0,077
	F	61	18	0,754	0,718	0,718	
<b>Localização</b>	Não extremidades	64	15	0,844	0,777	0,755	<b>&lt;0,001</b>
	Extremidades	38	22	0,579	0,442	0,442	
<b>Tamanho do tumor</b>	≤10cm	71	15	0,845	0,800	0,800	<b>0,048</b>
	>10cm	16	7	0,625	0,547	0,547	
<b>Número de cirurgias prévias</b>	0	65	12	0,846	0,828	0,828	<b>&lt;0,0001</b>
	1	24	16	0,458	0,333	0,333	
	2	6	6	0,500	0,167	0,167	
	3	2	2	0,500	0,000	0,000	
<b>Biópsia prévia</b>	Não	32	7	0,875	0,780	0,780	0,763
	Sim	51	12	0,804	0,780	0,780	
<b>Cirurgia</b>	Cirurgia combinada	13	1	1	0,917	0,917	<b>0,024</b>
	Cirurgia	85	36	0,694	0,593	0,576	

Cont/ Tabela 11

Variável	Categoria	n	Recidiva	Probabilidade de não ocorrer recidiva em			Valor p
				2 anos	5 anos	10 anos	
Tipo de cirurgia	Ressecção ampliada	88	27	0,784	0,698	0,698	0,794
	Amputação/desarticulação	1	0	1	1	1	
	Biopsia excisional	3	1	0,667	0,667	0,667	
Margem	Livre	60	16	0,783	0,729	0,729	0,321
	Comprometidas	33	12	0,727	0,663	0,663	
Tipo de mutação	Sem mutação	10	6	0,600	0,450	0,450	<0,0001
	41	29	8	0,828	0,720	0,720	
	41 e 45F	5	2	0,600	0,600	0,600	
	41 e 45P	1	0	1	1	1	
	45F	15	13	0,267	0,133	0,133	
	45P	6	2	1	0,833	0,556	
Tipo de mutação	Sem mutação	10	6	0,6	0,45	0,45	0,279
	Alguma mutação	56	25	0,679	0,569	0,546	
Tipo de mutação	Caso contrário	51	18	0,784	0,681	0,654	<0,0001
	45F	15	13	0,267	0,133	0,133	
Tipo de mutação margem livre	Caso contrário	26	5	0,846	0,806	0,806	<0,0001
	45F	8	6	0,375	0,250	0,250	
Frequência alélica	>10%	40	21	0,625	0,495	0,462	0,073
	<=10%	16	4	0,813	0,750	0,750	

#### 4.8 MODELO DE REGRESSÃO DE COX SIMPLES

Com o objetivo de avaliar a influência de cada variável independente na taxa de ocorrência de recidiva, ajustou-se um modelo de regressão de Cox simples para cada variável independentemente de interesse (covariável).

Na Tabela 12, há as estimativas dos parâmetros do modelo de regressão de Cox simples, na qual é possível observar que as variáveis independentes significativas são: idade, tamanho do tumor, localização, topografia 2, número de cirurgias prévias, tipo de mutação (exceto quando categorizado em sem mutação *versus* alguma mutação), tipo de mutação para os pacientes com as margens livres.

**Tabela 12** - Estimativas dos parâmetros do modelo de regressão de Cox simples.

Variável	Categoria	Estimativa	Erro padrão	Risco (RR)	Relativo	IC (95%) para RR		Valor p
						Inferior	Superior	
Idade	Contínua	-0,009	0,010	0,991		0,972	1,011	0,390
Idade	<=31 anos	0,785	0,345	2,192		1,115	4,308	<b>0,023</b>
	>31 anos	Ref						
Idade	<25	Ref						
	[25-50)	-0,345	0,346	0,708		0,360	1,393	0,317
	[50-75)	-0,230	0,633	0,794		0,230	2,749	0,716
Sexo	Masculino	0,575	0,331	1,778		0,930	3,399	0,082
Raça	Branco	0,384	0,633	1,468		0,425	5,072	0,544
Localização	Extremidades	Ref						
	Abdome não parede abdominal	-1,212	0,739	0,297		0,070	1,267	0,101
	Parede abdominal	-1,227	0,544	0,293		0,101	0,852	<b>0,024</b>
	Cabeça e pescoço	-0,916	0,545	0,400		0,137	1,165	0,093
	Parede torácica/dorso	-1,053	0,497	0,349		0,132	0,924	<b>0,034</b>
Topografia 2	Não extremidades	Ref						
	Extremidades	1,094	0,336	2,985		1,544	5,771	<b>0,001</b>
Topografia 1	Não abdominal	Ref						
	Abdominal	0,821	0,446	2,274		0,948	5,453	0,066

Cont/ Tabela 12

Variável	Categoria	Estimativa	Erro padrão	Risco (RR)	Relativo	IC (95%) para RR		Valor p
						Inferior	Superior	
Número de cirurgias prévias	0	Ref						
	1	1,769	0,386	5,865	2,751	12,500	<0,0001	
	>=2	2,012	0,465	7,477	3,004	18,610	<0,0001	
Número de cirurgias prévias	0	Ref						
	>=1	1,840	0,359	6,298	3,114	12,735	<0,0001	
Tipo de tratamento	Cirurgia combinado	Ref						
	Cirurgia	1,960	1,014	7,096	0,972	51,820	0,053	
Biopsia prévia	Sim	0,144	0,477	1,155	0,454	2,939	0,763	
Tamanho tumor	Contínua	0,036	0,035	1,037	0,968	1,111	0,305	
Tamanho tumor	<=10	Ref						
	>10	0,875	0,459	2,399	0,977	5,893	0,056	
	>=10	Ref						
Tamanho tumor	<5	-0,777	0,487	0,460	0,177	1,196	0,111	
	[5-10)	-1,331	0,559	0,264	0,088	0,790	0,017	
Margem	Comprometida	0,376	0,382	1,456	0,689	3,079	0,325	
Frequência alélica	Contínua	0,019	0,017	1,019	0,986	1,053	0,257	
Frequência alélica cut-off	<=10%	Ref						
	>10%	0,944	0,546	2,570	0,881	7,502	0,084	

Cont/ Tabela 12

Variável	Categoria	Estimativa	Erro padrão	Risco (RR)	Relativo	IC (95%) para RR		Valor p
						Inferior	Superior	
Frequência alélica	<=10%	Ref						
	(10-20]	1,054	0,585	2,869	0,912	9,029	0,072	
	>20%	0,836	0,592	2,308	0,723	7,367	0,158	
Tipo de mutação	Sem alteração	Ref						
	41	-1,087	0,542	0,337	0,116	0,976	<b>0,045</b>	
	45F	0,753	0,512	2,134	0,783	5,816	0,139	
	45P	-0,953	0,822	0,386	0,077	1,932	0,246	
Tipo de mutação	41	Ref						
	Sem alteração	1,088	0,542	2,967	1,025	8,586	<b>0,045</b>	
	45F	1,845	0,463	6,330	2,553	15,698	<b>&lt;0,0001</b>	
	45P	0,134	0,793	1,144	0,242	5,413	0,866	
Tipo de mutação	45F	Ref						
	Sem alteração	-0,758	0,512	0,469	0,172	1,278	0,139	
	41	-1,845	0,463	0,158	0,064	0,392	<b>&lt;0,0001</b>	
	45P	-1,711	0,768	0,181	0,040	0,813	<b>0,026</b>	
Tipo de mutação	Sem mutação	Ref						
	Alguma mutação	-0,488	0,456	0,614	0,251	1,501	0,285	
Tipo de mutação	45F ou 45P	Ref						
	Sem mutação	-0,227	0,491	0,797	0,304	2,086	0,644	
	41	-1,267	0,415	0,282	0,125	0,635	<b>0,002</b>	
Tipo de mutação	41	Ref						
	Sem mutação	1,040	0,518	2,829	1,026	7,803	<b>0,045</b>	
	45F ou 45P	1,267	0,415	3,551	1,575	8,005	<b>0,002</b>	

**Cont/ Tabela 12**

Variável	Categoria	Estimativa	Erro padrão	Risco (RR)	Relativo	IC (95%) para RR		Valor p
						Inferior	Superior	
Tipo de mutação	Sem mutação	Ref						
	41	-1,040	0,518	0,354	0,128	0,975	<b>0,045</b>	
	45F ou 45P	0,228	0,491	1,255	0,479	3,287	0,644	
Tipo de mutação	Caso contrário	Ref						
	45F	1,487	0,380	4,423	2,100	9,319	<b>&lt;0,0001</b>	
Tipo de mutação Margem livre	Caso contrário	Ref						
	45F	1,809	0,616	6,106	1,827	20,410	<b>0,003</b>	
Número de alteração molecular	0	Ref						
	1	-0,457	0,460	0,633	0,257	1,561	0,321	
	2	-0,780	0,818	0,458	0,092	2,276	0,340	

## 4.9 MODELOS DE RISCOS PROPORCIONAIS DE COX MÚLTIPLO

Para a construção dos modelos multivariados, foram selecionadas as variáveis que atingiram níveis de significância estatística na análise univariada ou que fossem de maior interesse no presente estudo. A seleção das variáveis para o modelo final foi obtida pelo método de *stepwise (backward)*, e a significância estatística foi determinada para um valor  $p < 0,05$ .

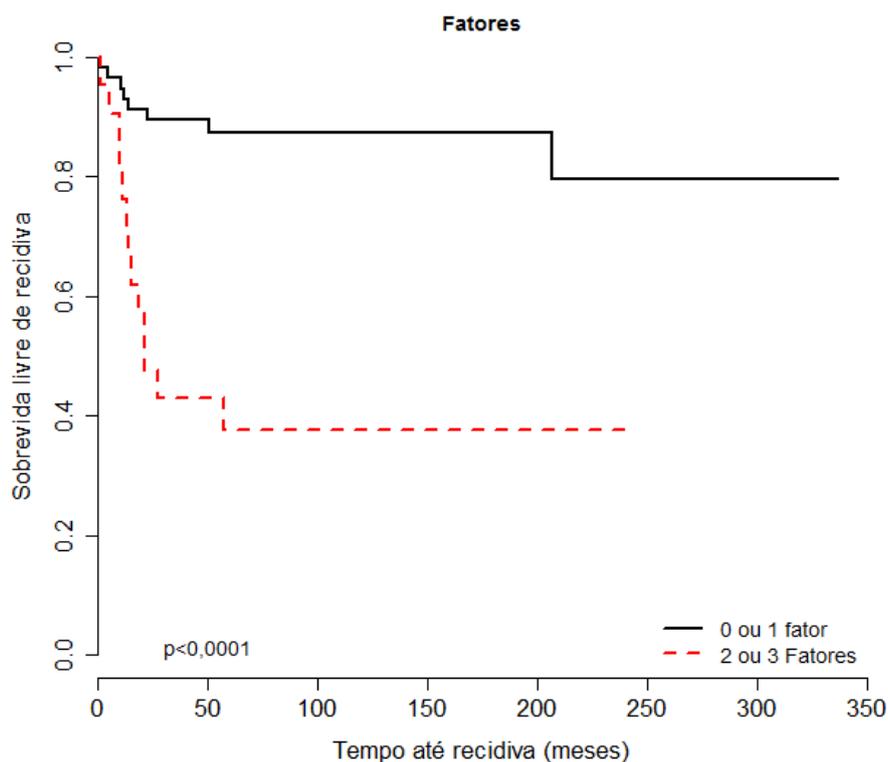
Na Tabela 13, foram apresentadas as estimativas dos parâmetros do modelo de riscos proporcionais de Cox múltiplo, fazendo uso apenas das variáveis demográfica e clínicas. As variáveis independentes consideradas no modelo inicial foram: idade (*cut-off*), topografia 2, número de cirurgias prévias e tamanho do tumor. Nesse cenário, o  $n$  válido é 82, sendo 21 pacientes recidivados.

**Tabela 13** - Estimativas dos parâmetros do modelo de regressão de Cox múltiplo.

Variável	Categoria	Estimativa	Erro padrão	Risco Relativo (RR)	IC (95%) para RR		Valor $p$
					Inferior	Superior	
Topografia 2	Não extremidades	Ref					
	Extremidades	1,895	0,523	6,652	2,388	18,531	<0,0001
Número de cirurgias prévias	0	Ref					
	≥1	1,415	0,481	4,115	1,604	10,556	0,003
Tamanho do tumor	≤10	Ref					
	>10	1,293	0,505	3,643	1,353	9,812	0,011

\*Variáveis independentes consideradas no modelo: idade (*cut-off*), topografia 2, número de cirurgias prévias e tamanho do tumor.

Sendo assim, identificamos três fatores cuja associação com o prognóstico de sobrevida livre de recidiva foi estatisticamente negativo e foi construída uma curva de Kaplan-Meier em que ficou evidenciado o pior prognóstico dos pacientes, conforme esses fatores foram agregados (Figura 21).



**Figura 21** - Curva de sobrevida livre de recidiva estimada via Kaplan-Meier em relação à variável número de fatores de pior prognóstico.

Desenvolveu-se, então, um modelo preditivo para o risco de recidiva local após o tratamento cirúrgico e, na Tabela 14, as estimativas dos parâmetros do modelo de riscos proporcionais de Cox simples, considerando como variável independente número de fatores de pior prognóstico (0 a 3 fatores de pior prognóstico). Os pacientes com dois ou três fatores têm um risco relativo (RR) igual a 5,97; IC [2,46 – 14,49] quando comparados aos pacientes com zero ou um fator.

**Tabela 14** - Estimativas dos parâmetros do modelo de regressão de Cox simples.

Variável	Categoria	Estimativa	Erro padrão	Risco Relativo (RR)	IC (95%) para RR		Valor p
					Inferior	Superior	
Número de fatores	0 ou 1	Ref					
	2 ou 3	1,788	0,452	5,975	2,463	14,490	<0,0001

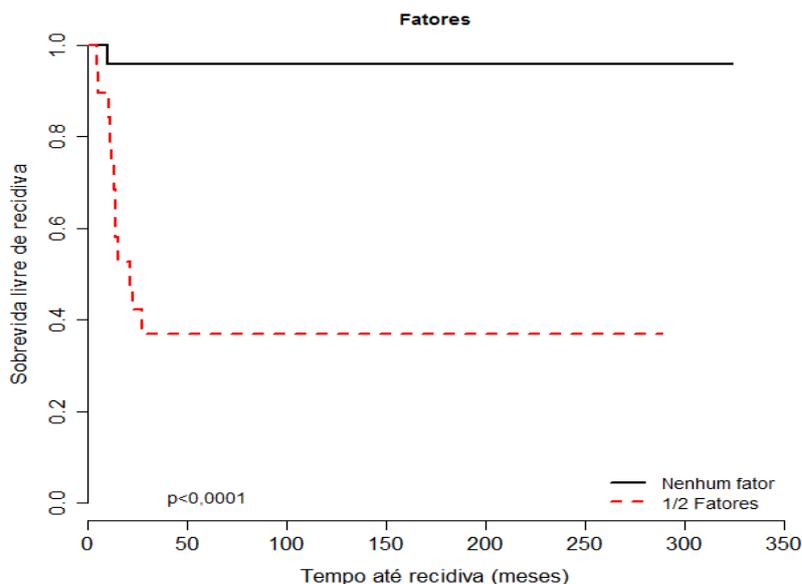
Já na Tabela 15 demonstrou-se um modelo de Cox múltiplo, considerando variáveis clínicas e moleculares (topografia 2, frequência alélica e tipo de mutação). Nessa configuração, o  $n$  válido é 56, sendo 25 pacientes recidivados, e as variáveis com significância estatística foram topografia 2 (extremidades *versus* não extremidades) e tipo de mutação (mutação S45F *versus* caso contrário).

**Tabela 15** - Estimativas dos parâmetros do modelo de regressão de Cox múltiplo.

Variável	Categoria	Estimativa	Erro padrão	Risco Relativo (RR)	IC (95%) para RR		Valor p
					Inferior	Superior	
Topografia 2	Não extremidades	Ref					
	Extremidades	1,148	0,431	3,151	1,354	7,336	0,008
Tipo de mutação	Caso contrário	Ref					
	45F	1,659	0,428	5,257	2,273	12,156	<0,0001

\*Variáveis independentes consideradas no modelo: localização, frequência alélica (*cut-off*) e tipo de mutação.

Por esse modelo, compreende-se que o risco de desenvolver uma recidiva local após uma cirurgia é de 3,15 vezes maior nos pacientes com lesões nas extremidades, quando comparados com os que apresentam lesão em outro lugar do corpo. Há um risco 5,25 vezes maior nos pacientes com mutação S45F quando comparados com os demais tipos de mutação ou com os pacientes sem qualquer mutação detectada.



**Figura 22** - Curva de sobrevida estimada via Kaplan-Meier em relação à variável número de fatores de pior prognóstico.

Na Figura 22, demonstrou-se uma diferença entre as curvas de sobrevida livre de recidiva dos pacientes sem fatores de pior prognóstico em relação àqueles com um fator ou dois fatores. Dessa forma, propusemos um modelo para avaliar o risco de desenvolvimento de recidiva local após o tratamento cirúrgico dos tumores desmoides, com base em fatores clínicos e moleculares.

**Tabela 16** - Estimativas dos parâmetros do modelo de regressão de Cox simples.

Variável	Categoria	Estimativa	Erro padrão	Risco Relativo (RR)	IC (95%) para RR		Valor $p$
					Inferior	Superior	
Número de fatores	0	Ref					
	1 ou 2	2,125	0,550	8,369	2,847	24,600	<b>0,0001</b>

Por fim, pode-se observar, na Tabela 16, que o risco de os pacientes com um ou dois fatores de pior prognóstico apresentarem recorrência local após a cirurgia é 8,36 vezes maior do que aqueles sem qualquer fator (IC [2,87 – 24,6];  $p = 0,0001$ ).

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 ASPECTOS GERAIS

Os tumores desmoides são raros, com incidência de 2,1 a 5,36 casos por milhão de habitantes segundo VAN BROEKHOVEN et al. (2015a). Em nosso centro, foram avaliados/tratados 214 pacientes durante 35 anos (média de seis casos por ano). Esses tumores apresentam comportamento clínico heterogêneo (GOLDBLUM e FLETCHER 2002) e vêm sendo tratados com diversas modalidades terapêuticas que ainda não estão muito bem padronizadas, com resultados incertos, muitas vezes não satisfatórios e com altos índices de recorrência após o tratamento (PAPAGELOPOULOS et al. 2006; BONVALOT et al. 2008; SALAS et al. 2011).

Se associarmos esses fatores ao desconhecimento exato da origem da célula tumoral, às lesões precursoras não descritas e a uma substancial falta de conhecimento ainda existente sobre os potenciais fatores de risco dessa doença (GRONCHI et al. 2013), é possível considerar esse contexto patológico enigmático e uma fonte muito extensa para investigação clínica e molecular.

Muitos estudos publicados analisaram um número relativamente pequeno de casos, principalmente quando são realizados com os dados de uma única instituição de saúde. Atualmente, observou-se a formação de grupos cooperativos multi-institucionais para o estudo e o tratamento dessa doença e, graças a esses consórcios, houve séries com casuísticas mais robustas, permitindo estudos mais elaborados.

O presente estudo objetivou: (i) reunir a casuística de tumores desmoides de um único centro brasileiro especializado no diagnóstico e tratamento de neoplasias; (ii) levantar dados demográficos, epidemiológicos e clínicos; (iii) avaliar a presença e frequência de mutação nos códons 41 e 45 do éxon 3 do gene *CTNNB1*, utilizando sequenciamento de segunda geração; e (iv) comparar os achados clínicos e moleculares, buscando

fatores que possam auxiliar na decisão terapêutica e/ou indicar um melhor ou pior prognóstico da doença.

Apesar de este estudo ter sido realizado em uma única instituição, apresentou-se uma casuística relevante, partindo de 169 pacientes com tumores desmoides, com um baixo número de pacientes perdidos de vista (7,5%) ao longo do tempo e com um tempo médio de seguimento bastante longo (134 meses). CRAGO et al. (2013) seguiram seus 495 pacientes por 60 meses; SALAS et al. (2011), com 370 pacientes, tiveram um seguimento de 52 meses; ZENG et al. (2014) seguiram seus 233 pacientes por 54 meses; HE et al. (2015) seguiram seus 114 pacientes por 72,5 meses; e COLOMBO et al. (2015), com uma série de 94 pacientes, apresentaram um tempo de seguimento de 76 meses. Quando se comparou o seguimento deste estudo com as grandes séries da literatura, foi possível perceber que o seguimento médio foi bem maior do que a maioria dos trabalhos, podendo chegar, às vezes, ao dobro do tempo médio de seguimento dessas outras séries.

A taxa global de sobrevida livre de recidiva (SLR) de nossos pacientes foi de 74,5%, em 2 anos; de 65,1%, em 5 anos; de 63,7%, em 10 anos; e de 59,5%, em 20 anos. Logo, a probabilidade de se ter uma recidiva em até 2, 5 10 e 20 anos seria de 25,5%, 34,9%, 36,3% e 40,5% respectivamente, e esses dados são semelhantes aos encontrados na literatura (KOTILIGAM et al. 2008; CRAGO et al. 2013; HE et al. 2015).

## **5.2 ASPECTOS DEMOGRÁFICOS E CLÍNICOS**

As características demográficas e clínicas foram colhidas e avaliadas em toda população de pacientes com tumores desmoides esporádicos do A.C.Camargo Cancer Center, de 1980 a 2015, que cumpriram os critérios de inclusão e não possuíam critério de exclusão (107 pacientes).

Ressaltamos que, no presente estudo, a princípio, foram excluídos os pacientes com polipose adenomatosa familiar (FAP), pois esses indivíduos apresentam lesões com características clínicas e moleculares específicas, e

seu prognóstico é significativamente diferente do de pacientes com tumores desmoides esporádicos.

Muitos grupos de estudo vêm procurando fatores clínicos que possam ser preditores de recorrência após a ressecção cirúrgica (GRONCHI et al. 2003; BONVALOT et al. 2008; LAZAR et al. 2008; SALAS et al. 2011; MULLEN et al. 2012; PENG et al. 2012; CRAGO et al. 2013; HUANG et al. 2014; ZENG et al. 2014; CATES e STRICKER 2014; COLOMBO et al. 2015; HE et al. 2015). Alguns fatores têm se mostrado constantes em predizer risco aumentado para recorrência; outros não são tão constantes, o que determina uma controvérsia ainda distante de ser resolvida.

O gênero feminino tem se mostrado o mais acometido por tumores desmoides. CRAGO et al. (2013) demonstraram, em um estudo coorte de 495 pacientes, uma razão de duas mulheres para cada homem acometido. Neste presente estudo, evidenciou-se uma razão de 1,43 mulher para cada homem (63 mulheres/44 homens).

O gênero não se apresentou como um fator de pior prognóstico neste estudo, assim como foi observado na literatura (GRONCHI et al. 2003; SALAS et al. 2011; CRAGO et al. 2013).

A variável idade demonstrou ser um fator de prognóstico negativo em diversos estudos (SALAS et al. 2011; SORENSEN et al. 2002; CRAGO et al. 2013; HE et al. 2015). Neste estudo, evidenciou-se que a idade, quando observada de forma contínua, não representava um risco elevado para recorrência local. Todavia, quando se realizou tal análise, observando o ponto de corte de 31 anos, foi encontrado um ponto de inflexão para a idade que demonstra uma significativa diferença entre os grupos ( $> 31$  anos e  $\leq 31$  anos). Os pacientes com idade igual ou menor do que 31 anos têm uma probabilidade de sobrevida livre de recidiva em dois, cinco e dez anos de até 62%, 53,9% e 53,9%, respectivamente, enquanto os pacientes com mais de 31 anos têm 86,5%, 76,1% e 73,1%, respectivamente ( $p = 0,02$ ) e, pelo modelo de regressão de Cox univariado, foram encontrados um risco relativo de 2,19 (IC [1,11 – 4,30] e um valor  $p = 0,023$ ), ou seja, pacientes

com idade menor ou igual a 31 anos apresentam um risco duas vezes maior de apresentar uma recidiva do que os pacientes com idade maior do que 31 anos.

Os trabalhos de ROCK et al. (1984), SORENSEN et al. (2002) e SALAS et al. (2011) identificaram a idade como fator prognóstico negativo em uma análise univariável para os pacientes com idades menores do que 30, 31 e 37 anos, respectivamente. SORENSEN et al. (2002), SALAS et al. (2011) e CRAGO et al. (2013) demonstraram que a idade menor do que 32, 37 e 26 anos também era um fator de pior prognóstico para recidiva quando realizada a análise multivariada. Já no modelo multivariado deste presente estudo, a idade não apresentou significância estatística para ser considerada um fator independente de pior prognóstico.

O tamanho da tumoração tem sido bastante investigado como preditor de recidiva. Vários autores já demonstraram que o tamanho está associado a um maior risco de recorrência local, porém, o tamanho de maior risco ainda é discutível. Neste estudo, percebeu-se que os pacientes com tumores maiores do que 10 centímetros têm uma probabilidade de apresentar uma recidiva aos cinco anos de seguimento de até 45,3%, enquanto os pacientes com tamanho menor ou igual a 10 centímetros têm uma probabilidade de 20% ( $p = 0,048$ ). Já o modelo de Cox simples demonstrou um risco 2,39 vezes maior de um paciente com tumor maior do que 10 centímetros desenvolver recidiva quando comparado aos pacientes cujo tamanho da tumoração é igual ou menor do que 10 centímetros (IC [0,97 – 5,89];  $p = 0,05$ ). E, quando se olha para a subdivisão clássica quanto ao tamanho dos tumores de partes moles (< 5 centímetros; entre 5 e 10 centímetros;  $\geq 10$  centímetros), verifica-se uma redução do risco para desenvolver recorrência local da ordem de 73,6% dos pacientes cuja tumoração está entre 5 e 10 centímetros quando comparado àqueles com tamanho maior do que 10 centímetros (IC [0,08 – 0,79];  $p = 0,017$ ).

Em 2011, SALAS et al. descreveram o tamanho do tumor como um fator independente de pior prognóstico em seus mais de 300 casos de tumores desmoides. Esses autores demonstraram que pacientes com

tumores maiores do que 7 centímetros tinham maior risco de recidiva local. Há descrições ainda de séries de casos, como os 211 casos de PENG et al. (2012) e os 114 casos de HE et al. (2015) com resultados semelhantes, evidenciando o pior prognóstico para os pacientes com tumores medindo acima de 7 e 8 centímetros, respectivamente. Deve-se citar, também, o artigo de CRAGO et al. (2013) com 495 casos, demonstrando evidências, em uma análise multivariada, de que pacientes com tumores maiores do que 10 centímetros apresentam índices piores de sobrevida livre de recorrência. Tal como esse último autor, neste estudo os dados extraídos dos modelos de Cox multivariados (Tabela 13) demonstraram também um risco maior para recorrência local para pacientes com tumores maiores do que 10 centímetros em relação aos demais, risco relativo de 3,64 (IC [1,35 – 9,81];  $p = 0,01$ ), o que possibilita o entendimento de que o tamanho do tumor ao diagnóstico pode realmente ser um fator independente de pior prognóstico para a recidiva local após o tratamento cirúrgico.

A localização também tem sido avaliada por vários autores como um fator clínico preditor de recidiva local, porém essa variável aparece nos artigos categorizada de forma não padronizada, o que torna mais difícil e menos preciso a avaliação da localização como fator prognóstico. Todavia, foram analisados os artigos de sete importantes séries da literatura (BONVALOT et al. 2008; SALAS et al. 2011; PENG et al. 2012; CRAGO et al. 2013; ZENG et al. 2014; CATES e STRICKER 2014; HE et al. 2015) e neles foi evidenciada uma diferença na sobrevida livre de recidiva, levando em consideração a localização, tal como se observou nos resultados deste estudo.

SALAS et al. (2011) e PENG et al. (2012) subdividiram os pacientes em grupos com lesões abdominais e extra-abdominais e observaram uma pior sobrevida naqueles pacientes com lesões extra-abdominais. Esse resultado não foi observado na série deste presente estudo. Contudo, quando os pacientes foram categorizados em cinco subgrupos (extremidades, abdome não parede abdominal, parede abdominal, cabeça/pescoço e parede torácica/dorso), observou-se uma redução do

risco de recorrência local da ordem de 70,7% para os pacientes com lesões na parede abdominal e de 65,1% para os pacientes com lesões na parede torácica/dorso quando comparados aos casos com lesões nas extremidades,  $p = 0,024$  e  $p = 0,034$ , respectivamente. BONVALOT et al. em 2008, demonstraram tanto em sua análise univariada quanto na multivariada um pior prognóstico dos pacientes com lesões nos membros. CRAGO et al. (2013) observaram uma melhor sobrevida livre de recidiva nos pacientes cujas lesões se localizavam na parede abdominal, assim como a pior sobrevida era daqueles cujas lesões estavam nas extremidades. Com base nesses achados, optou-se também por subdividir os casos deste estudo em pacientes com lesões nas extremidades (cinturas e membros) e pacientes com lesões em outros sítios (não extremidades). Dessa forma, evidenciou-se uma pior sobrevida livre de recidiva nos pacientes cujas lesões se localizavam nas extremidades (SLR em dois, cinco e dez anos de até 57,9%, 44,2% e 44,2%) quando comparados com os pacientes com lesões em outros sítios (SLR em dois, cinco e dez anos de 84,4%, 77,7% e 75,5%;  $p < 0,001$ ). Observou-se, também, pelo modelo de regressão univariada, que o risco de um paciente com uma tumoração em alguma região considerada extremidade ter uma recidiva é quase três vezes maior do que aqueles não extremidades (RR = 2,89; IC [1,54 – 5,71];  $p = 0,001$ ). E, ao se analisar o modelo de Cox multivariado, utilizando variáveis demográficas e clínicas propostas neste estudo na Tabela 13, demonstrou-se que a variável localização é independente para predizer risco de aumento para desenvolver recidiva local, pois os pacientes com lesões nas extremidades apresentaram um RR de 6,65 (IC [2,38 – 18,53];  $p < 0,0001$ ).

Muitos trabalhos também analisaram se o tipo de tratamento teria influência na sobrevida livre de recidiva. Todos os pacientes deste presente estudo foram tratados com cirurgia. A maioria foi submetida, apenas, à ressecção ampliada e alguns foram submetidos à ressecção ampliada combinada com quimioterapia, radioterapia ou ambas as modalidades. Nenhum dos pacientes submetidos à terapia combinada apresentou recidiva

local nos dois primeiros anos, enquanto 30,6% dos pacientes submetidos apenas ao tratamento cirúrgico estavam recidivados ao final de dois anos de seguimento. No seguimento de cinco e dez anos, a probabilidade de ter um recidiva foi de 8,3% nos pacientes tratados com terapia combinada e de 40,7% e 42,4% ( $p = 0,024$ ), respectivamente, para os tratados apenas com cirurgia.

No modelo de regressão univariada deste estudo, houve uma tendência a um melhor prognóstico do grupo tratado com terapia combinada, pois o grupo tratado apenas com cirurgia teve um risco sete vezes maior de ter uma recidiva em comparação com os casos tratados com terapia combinada (IC [0,97 – 51,82];  $p = 0,05$ ). Esse assunto é bastante controverso na literatura, BONVALOT et al. (2008), HUANG et al. (2014), CATES e STRICKER (2014) e HE et al. (2015) não observaram em suas séries uma maior sobrevida livre de recidiva dos pacientes submetidos à radioterapia adjuvante quando comparados àqueles submetidos apenas à cirurgia. NUYTENS (2000) realizou um estudo retrospectivo, analisando 22 artigos, e concluiu que a radioterapia associada à cirurgia permitiria um controle local em 78% dos pacientes, enquanto a cirurgia exclusiva demonstrou um controle em 62% dos casos. Assim como BERRI et al. (2011), entendeu-se que a radioterapia é efetiva no controle local dos desmoides e, quando a ressecção adequada não mutilante não é possível, a radioterapia associada pode ser consideravelmente efetiva em pacientes selecionados.

Ainda analisando o tratamento dos pacientes com tumores desmoides, observou-se um número razoável de pacientes operados inicialmente em outras instituições. Acreditamos que, por ser um centro de referência em tratamento oncológico, muitos dos pacientes deste estudo não chegam intactos ao nosso serviço e, ao se investigar como seria a evolução dos pacientes operados previamente em outro serviço, percebeu-se neles uma sobrevida livre de recidiva pior do que os que chegaram intactos à instituição, conforme demonstrado na Tabela 11. Ajustou-se, então, um modelo de Cox simples para essa variável e observou-se que os

pacientes que foram submetidos a um ou a mais procedimentos cirúrgicos em outros serviços apresentaram um risco 6,29 vezes maior de ter uma recidiva quando comparados aos pacientes sem abordagem cirúrgica prévia (IC [3,11 – 12,73];  $p < 0,0001$ ). No modelo de Cox multivariado (Tabela 13), evidenciou-se um risco 4,11 vezes maior de desenvolver recidiva local nos pacientes com um ou mais procedimentos cirúrgicos prévios quando comparados com os não operados (IC [1,60 – 10,55];  $p = 0,003$ ). Dessa forma, pode-se inferir que os pacientes operados previamente têm algum fator relacionado ao primeiro procedimento que muito influenciou na persistência ou recidiva da doença. Entretanto, não temos como saber se esse fato se deve a uma cirurgia inadequada ou a uma contaminação do leito cirúrgico ou até mesmo ao próprio trauma cirúrgico.

Por fim, analisou-se a importância das margens cirúrgicas influenciando na recorrência e em sua associação à sobrevida livre de recidiva. Parece óbvio afirmar que o comprometimento de uma margem cirúrgica está associado a uma pior sobrevida livre de recorrência. Todavia, existe uma significativa controvérsia na literatura sobre esse assunto (HE et al. 2015). Dois estudos realizados com um grande número de casos evidenciaram diferentes resultados. ZENG et al. (2014) estudaram 233 casos de tumores desmóides e concordaram que a ressecção com margem cirúrgica microscopicamente comprometida estava associada a uma pior sobrevida livre de recorrência. No entanto, no estudo realizado por CRAGO et al. (2013), estudo este com maior número de casos com tumores desmóides, não houve associação do comprometimento das margens a uma pior sobrevida livre de recorrência, tanto na análise univariável como na multivariável.

Neste presente estudo, as margens cirúrgicas estavam livres de comprometimento em 44 casos não recidivados e em 18 casos recidivados e estavam comprometidas em 21 casos não recidivados e 12 recidivados ( $p = 0,617$ ). A análise de *log-rank* ( $p = 0,321$ ) para as curvas de sobrevivência relacionadas às margens cirúrgicas, bem como para o modelo de Cox

simples ( $p = 0,325$ ), permite afirmar que não há indícios de influência das margens cirúrgicas no evento recidiva.

Em 2014, CATES e STRICKER observaram que algumas das margens cirúrgicas consideradas livres, porém próximas, são na verdade, margens comprometidas, e as amostras inadequadas de margens cirúrgicas enviadas aos patologistas são o verdadeiro fator de a variável margem cirúrgica não ser capaz de prever o risco de recorrência local em muitos estudos.

O estudo publicado em 2015 por HE et al. agrupou os pacientes com margem macro e microscopicamente comprometidas de um lado e os pacientes com margens livres do outro lado. Esse estudo demonstrou que as margens comprometidas são fatores preditores de recidiva local (RR = 2,64;  $p = 0,027$ ) e, em sua discussão sobre as margens, concluiu que há dificuldade em alcançar uma margem adequada durante a cirurgia de ressecção dos tumores desmoides. Igualmente, neste presente estudo entende-se que de fato é muito difícil conseguir uma margem cirúrgica adequada nos tumores desmoides e mais difícil ainda talvez seja saber se microscopicamente elas estão adequadas.

### **5.3 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR**

O presente estudo analisou amostras de DNA de 77 pacientes portadores de tumores desmoides esporádicos, e o sequenciamento de segunda geração foi concluído com sucesso em 71 amostras.

As mutações nos códons 41 e 45 no éxon 3 do gene codificante da betacatenina foram estudadas pelo método de Sanger por vários autores (AMARY et al. 2007; LAZAR et al. 2008; MULLEN et al. 2013; COLOMBO et al. 2013). Todavia, poucos estudos dessas mutações foram feitos por sequenciamento de próxima geração (NGS).

Essa nova metodologia (NGS) para sequenciamento está sendo cada vez mais utilizada para apoiar o diagnóstico histológico dos tecidos, apresentando maior sensibilidade para detectar mutações em baixa

frequência em tumores sólidos do que os demais métodos de sequenciamento. A análise mutacional direcionada usando tecidos fixados em formalina e embebidos em parafina é extremamente desafiadora em razão da baixa qualidade de DNA e, nesse cenário, o NGS tem um excelente desempenho. Além disso, é um meio eficiente para auxiliar o diagnóstico microscópico (YOST et al. 2012; SALTO-TELLEZ e GONZALEZ DE CASTRO 2014).

O NGS tem ainda o benefício adicional de detectar múltiplas mutações em genes de interesse particular em um único teste, o que também o torna eficaz na prática clínica, por conta de seu adequado tempo de execução e seu bom custo-eficácia (DESAI e JERE 2012; KATSANIS e KATSANIS 2013). Em razão da alta incidência de mutações no gene *CTNNB1* verificadas nos tumores desmoides, essa tecnologia é ideal para o desenvolvimento de testes diagnósticos (LE GUELLEC et al. 2012).

Em uma publicação de 2015, AITKEN et al. demonstraram os resultados de seu estudo ao comparar o sequenciamento clássico ao sequenciamento de próxima geração (NGS) em espécimes de tumores desmoides. Seus dados demonstram uma maior sensibilidade do NGS em relação aos métodos precursores e uma especificidade de 100%.

A prevalência de mutação no gene *CTNNB1* nos tumores desmoides esporádicos apresenta uma ampla variabilidade na literatura. Nos estudos mais antigos como o publicado por MIYOSHI et al. em 1998, observou-se alguma mutação em 54% dos espécimes. TEJPAR et al. em 1999, apresentaram resultados semelhantes (52%). Em 2007, AMARY et al. observaram mutações em 76% de seus espécimes. LAZAR et al. em 2008, demonstraram uma prevalência de mutação em 85% de seus espécimes. Em 2013, MULLEN et al. reportaram mutações em 73% dos tumores estudados. BROEKHOVEM et al. em 2015, encontraram uma prevalência de 76%. Com o aumento da sensibilidade do sequenciamento de segunda geração, a prevalência dessas mutações tende a aumentar. O estudo apresentado por AITKEN et al. (2015) evidenciou mutações em aproximadamente 92% dos espécimes. Neste presente estudo, detectamos

85,9% de espécimes com alguma mutação nos códons 41, 45 ou em ambos (41 e 45) no éxon 3 do gene *CTNNB1* 10 espécimes (14,1%) não apresentavam qualquer mutação nesses códons.

Assim, observa-se que os dados deste estudo sobre a prevalência estão muito próximos dos resultados mais recentemente encontrados na literatura. No entanto, espera-se encontrar uma prevalência mais parecida com a apresentada por AITKEN et al. (2015), visto que o método de detecção usado se assemelha muito ao desse grupo. Questionou-se se algum viés poderia ter ocorrido em nosso método, porém, após uma revisão das análises, não foram encontrados erros de metodologia. Uma das possíveis explicações para os casos negativos é a ocorrência de mutações em outras localizações do éxon 3. Nesse sentido, LE GUELLEC et al. (2012) e AITKEN et al. (2015) demonstraram alguns poucos espécimes com mutações em outros códons da betacatenina, por exemplo, nos códons 34 e 37. Entretanto, ainda observaram um grupo sem mutações evidentes. Neste presente estudo, como a região avaliada do gene *CTNNB1* compreendeu os códons 26 ao 68, região em que estão descritas as demais mutações já relatadas em tumores desmoides, é possível ter outras mutações em códons distintos que precisam ser avaliadas. Uma segunda explicação seria a ocorrência de mutações no gene *APC* em alguns desses desmoides clinicamente considerados não FAP, ou seja, tumores esporádicos. CRAGO et al. (2015) identificaram dois pacientes com mutação no gene *APC* entre os seus oito pacientes considerados inicialmente selvagens, e ambos também apresentaram a perda do número de cópias em um trecho do cromossomo 5 que engloba *APC*, sugerindo um *segundo hit* que contribui para o desenvolvimento desses tumores. Ainda, poderiam existir outros genes associados ou não à via de sinalização Wnt com mutações associadas ao desenvolvimento de tumores desmoides. CRAGO et al. (2015) também evidenciaram um caso de mutação no gene *BMI1* (gene ativador da sinalização de Wnt). Em dois espécimes, nenhuma mutação nos genes que regulam a sinalização de Wnt (*CTNNB1*, *APC* ou *BMI1*) foi encontrada, mas essa análise demonstrou a perda do cromossomo 6.

Com relação aos tipos de mutação encontrados, observa-se a presença de três mutações em dois códons (41 e 45) no éxon 3 do gene codificante da betacatenina. Noventa por cento dos casos (55 de 61) apresentavam somente uma mutação (códon 41 ou códon 45) e 10% (6 de 61) apresentavam duas mutações, sendo elas no códon 41 (T41A) e no 45 (S45F ou S45P).

A mutação no códon 41 (p.Thr41Ala - T41A) ocorreu em 33 pacientes (46,5%). Em 16 pacientes (22,5%), ocorreu a mutação p.Ser45Phe (S45F ou 45F) e, em 6 (8,5%), a mutação p.Ser45Pro (S45P ou 45P). Em cinco pacientes (7%), houve as mutações T41A e S45F e, em apenas um caso (1,4%), ocorreu a mutação T41A e S45P.

A mutação mais comumente descrita na literatura foi a p.Thr41Ala (T41A), acometendo aproximadamente 50%, seguida da mutação p.Ser45Phe (S45F) com cerca de 30% dos espécimes estudados (LAZAR et al. 2008; DÔMONT et al. 2010; MULLEN et al. 2013; COLOMBO et al. 2013; VAN BROEKHOVEN et al. 2015b; AITKEN et al. 2015).

Na série deste presente estudo, a mutação mais frequente foi a T41A, ocorrendo em 46,5%. LAZAR et al. em 2008, observaram a mutação T41A em 51% de seus casos, MULLEN et al. (2013), VAN BROEKHOVEN et al. (2015b) e AITKEN et al. (2015) relataram a mutação T41A em 46%, 48,5% e 47,2% dos casos, respectivamente. Dessa forma, entendemos que o dado do presente estudo está condizente com a literatura.

Segundo LAZAR et al. (2008), a mutação S45F ocorreu em 28% de suas amostras, já nos estudos de MULLEN et al. (2013), VAN BROEKHOVEN et al. (2015b) e AITKEN et al. (2015), a mutação S45F ocorreu em 25%, 17,82% e 35,41% dos casos, respectivamente. Observou-se, neste presente estudo, a ocorrência da mutação S45F em 22,5% das amostras, ou seja, tal valor está dentro do intervalo de valores encontrados na literatura (17% a 35%).

A mutação S45P ocorreu em 7% dos casos no grupo de LAZAR et al. (2008); em 3,94%, no grupo de VAN BROEKHOVEN et al. (2015b); em 1,7%, no grupo de MULLEN et al. (2013); e, em 2,08%, nos casos de

AITKEN et al. (2015). Neste estudo, evidencia-se a presença da mutação S45P em 8,5% das amostras, valor muito próximo ao encontrado por LAZAR et al. (2008), mas essa ocorrência chega a ser cerca de duas vezes maior do que a observada por VAN BROEKHOVEN et al. (2015b) e a ser quatro vezes maior do que a observada pelos grupos de MULLEN et al. (2013) e AITKEN et al. (2015).

Observa-se, também, uma dupla mutação (T41A associada a S45F ou S45P) em seis amostras (8,5%). Essa ocorrência não foi descrita por LAZAR et al. (2008) e apareceu em um caso da série de MULLEN et al. (2013). Entende-se que tal diferença possa estar relacionada à diferença de método de detecção das mutações, pois neste presente estudo foi realizado pelo método NGS e esses outros dois estudos foram realizados pelo método de Sanger (primeira geração). Não foram descritas, nos artigos de VAN BROEKHOVEN et al. (2015b) e de AITKEN et al. (2015), referências sobre duplas mutações, principalmente pelo agrupamento de algumas ocorrências menores em um grupo denominado pelos autores de *outros*.

Ressalta-se que, no presente estudo, a princípio, com base nas características clínicas, foram excluídos os pacientes com FAP, pois estes indivíduos apresentam lesões com características clínicas e moleculares específicas, e seu prognóstico é significativamente diferente do de pacientes com tumores desmoides esporádicos. No entanto, o sequenciamento do painel de 409 genes, apesar de ter sido de qualidade insuficiente para a análise de todos os genes, identificou um tumor com uma deleção no gene *APC* classificado como mutação patogênica. Como a frequência alélica foi de 81%, não se pode descartar a possibilidade de ser um tumor desmoide de um paciente FAP, portador de uma mutação germinativa.

Analisou-se, ainda, a incidência de uma mutação específica no gene *CTNNB1* e correlacionou-se com as características demográficas (gênero, idade e localização) e, tal como MULLEN et al. (2013), não houve uma diferença significativa na distribuição das mutações de acordo com essas variáveis. LAZAR et al. (2008) encontraram uma associação entre o gênero masculino e a mutação no gene *CTNNB1*, enquanto LE GUELLEC et al.

(2012) e COLOMBO et al. (2013) encontraram uma maior prevalência da mutação S45F em pacientes com tumores extra-abdominais.

A frequência alélica ou porcentagem de mutação no caso estudado (razão do número de leituras da variante de interesse no total de leituras de bases) ou ainda fração de alelo variante (VAF) também foi estudada neste estudo. A média dos valores da fração de alelo variante na amostra global foi de 16,54% e a mediana de 14,45%. AITKEN et al. (2015) obtiveram uma média global do VAF de 23,1% em seu estudo de 133 espécimes de tumores desmoides esporádicos com alguma mutação no gene *CTNNB1*. O valor médio da frequência alélica, deste presente estudo, é um pouco menor que o desse autor, mas ainda muito próximo do mesmo, de maneira que não é possível realizar qualquer inferência sobre essa diferença.

Categorizou-se a variável frequência alélica em três grupos de acordo com a porcentagem apresentada, ou seja, pacientes com menos de 10%, pacientes com mais de 10% e menos do que 20% e pacientes com mais de 20% de fração de alelo variante e correlacionou-se com as variáveis demográficas (gênero, idade, localização), bem como com os achados do sequenciamento (tipo de mutação) e não se observou correlação da frequência alélica com tais variáveis.

Neste presente estudo, também, investigou-se se a frequência alélica (VAF) poderia estar relacionada com a recidiva local. Para essa avaliação, foi ajustado um ponto de corte e, então, estudou-se o comportamento dos pacientes com VAF maior *versus* menor ou igual a 10%. Observou-se, nos pacientes com frequência alélica menor ou igual a 10%, uma sobrevida livre de recidiva em dois, cinco e dez anos de 81,3%, 75% e 75%, respectivamente, e, nos pacientes com frequência alélica maior do que 10%, uma SLR de 62,5%, 49,5% e 46,5%, respectivamente. Apesar de o valor  $p = 0,073$  não ser estatisticamente significativo, observou-se uma clara tendência a uma pior sobrevida dos pacientes com frequência alélica maior do que 10%. Essa tendência também foi observada no modelo de Cox univariado com um risco de desenvolver recidiva 2,5 vezes maior nos pacientes com frequência alélica acima de 10% em relação aos com VAF

igual ou abaixo de 10% (IC [0,88 – 7,50];  $p = 0,08$ ). Não foram encontrados na literatura estudos correlacionando frequência alélica com sobrevida ou prognóstico dos tumores desmoides, entende-se que esses dados surgem com o sequenciamento de nova geração e pouquíssimos trabalhos sequenciaram amostras de tumores desmoides por NGS. AITKEN et al. (2015), autores cuja análise das amostras de tumores desmoides foi realizada por NGS, estudaram a frequência alélica e não fizeram nenhuma menção nem associação entre a frequência alélica e a sobrevida livre de recidiva ou com o prognóstico. Talvez, em um próximo estudo, deva-se aumentar a amostra para averiguar se essa tendência se confirma em uma amostra maior e/ou para observar como a frequência alélica se comporta em relação à progressão da doença, entretanto, para responder a essa última pergunta, é necessário delinear um estudo prospectivo.

Pesquisou-se, ainda neste presente estudo, se alguma mutação específica da região codificante referente ao éxon 3 da betacatenina ou a ausência de mutação do mesmo estava associada ao desfecho clínico recidiva local e foi observado um pior prognóstico nos pacientes com espécimes cuja mutação S45F havia sido detectada. A sobrevida livre de recidiva dos pacientes com mutação S45F em dois, cinco e dez anos foi respectivamente de 26,7%, 13,3% e 13,3%, isto é, muito menor que a dos demais pacientes com outra mutação ou sem mutação (caso contrário) 78,4%, 68,1% e 65,4% ( $p < 0,0001$ ). Entretanto, essa análise foi realizada sem segregar os pacientes cujas margens cirúrgicas estavam microscópica ou macroscopicamente comprometidas. Sendo assim, a fim de excluir o fator comprometimento de margem, seja micro, seja macroscópica, propôs-se uma outra análise para as curvas de sobrevida livre de recorrência local estratificada pelo tipo de mutação, incluindo apenas os pacientes com margens cirúrgicas livres de comprometimento, e observou-se uma sobrevida livre de recidiva para os pacientes com mutação S45F em dois, cinco e dez anos de 37,5%, 25% e 25%, respectivamente, ou seja, muito menor que a dos demais (caso contrário) 84,6%, 80,6% e 80,6% ( $p < 0,0001$ ). Dessa forma, pode-se afirmar que os pacientes com a mutação

S45F apresentaram, neste estudo, uma pior sobrevida quando comparado aos demais pacientes.

O impacto do *status* mutacional do gene *CTNNB1* em relação à recidiva dessa doença ainda é questionável. DÔMONT et al. (2010), MULLEN et al. (2013) e AITKEN et al. (2015) realizaram estudos que não evidenciaram a associação entre o evento recidiva local e a mutação S45F. Todavia, alguns estudos, como os de LAZAR et al. (2008), COLOMBO et al. (2013) e VAN BROEKHOVEN et al. (2015b), demonstraram uma associação da mutação S45F com o risco aumentado de recidiva após ressecção cirúrgica da lesão. Tal como esses últimos três autores, este presente estudo demonstrou um maior risco de desenvolver recidiva local após o tratamento cirúrgico nos pacientes com mutação S45F. VAN BROEKHOVEN et al. (2015b) demonstraram, pelo modelo de Cox Simples, um risco 8,5 vezes maior ( $p = 0,006$ ) de apresentar recidiva nos pacientes S45F mutados quando comparados com os demais e, no modelo multivariado, o risco relativo foi de 6,2 ( $p < 0,001$ ). LAZAR et al. (2008) obtiveram um RR de 4,28 nas análises uni e multivariadas ( $p = 0,0015$ ).

No grupo deste estudo, evidenciou-se, pelo modelo de Cox univariado ajustado para todos os casos, um risco 4,42 vezes maior ( $p < 0,0001$ ) de os pacientes com mutação S45F desenvolverem recidiva local quando comparados com os demais pacientes, e um risco 6,10 vezes maior ( $p = 0,003$ ) quando se ajustou o modelo apenas para os pacientes com margens cirúrgicas não comprometidas. No modelo multivariado, o risco relativo foi de 5,25 vezes (IC [2,27 – 12,15];  $p < 0,0001$ ). Sendo assim, concluiu-se que, tal como LAZAR et al. (2008), COLOMBO et al. (2013) e VAN BROEKHOVEN et al. (2015b), os pacientes com tumores desmoides com mutação S45F realmente apresentam um pior prognóstico. Logo, entende-se ser de grande importância levar em consideração esse tipo de mutação ao indicar um procedimento cirúrgico para a ressecção da lesão, pois, mesmo se for possível conseguir realizar uma cirurgia com margens adequadas, esses pacientes terão um alto risco de apresentar uma recidiva local. E, se ainda assim o tratamento cirúrgico for realizado, o cirurgião deve

ficar muito mais atento à recorrência, realizando exames de controle mais precocemente, inclusive cogitando um tratamento adjuvante como a radioterapia.

Contudo, assim como MUSHRIQ et al. (2015), neste presente estudo considerou-se ser pouco provável que apenas um fator, como a mutação S45F, pudesse explicar todos os dados referentes à recorrência local. Neste estudo, foram demonstrados, pelo modelo de Cox multivariado, três fatores clínicos (tumores localizados nas extremidades, uma ou mais cirurgias prévias e tamanho do tumor maior do que 10 centímetros) e um fator molecular (mutação S45F) de pior prognóstico para o desenvolvimento de recidiva local. Portanto, para melhor avaliar o risco de recidiva, propôs-se a divisão dos pacientes portadores de tumores desmoides em grupos prognósticos com base no número de fatores de prognóstico desfavoráveis evidenciados em análises e apresentados para cada paciente.

Dois modelos foram apresentados, sendo um deles (modelo 1) envolvendo apenas fatores clínicos e o outro combinando fatores clínicos e moleculares (modelo 2). Na primeira situação, considerou-se a variável número de fatores de pior prognóstico em duas categorias, aqueles com zero ou um fator (baixo risco para recidiva após cirurgia) e aqueles com dois ou três fatores (alto risco para recidiva após cirurgia) e observou-se, no grupo com dois ou três fatores, um risco 5,97 vezes maior de recidiva do que aqueles pacientes com zero ou um fator (IC [2,46 – 14,49];  $p < 0,0001$ ). Na segunda situação, também foi considerado o número de fatores de pior prognóstico, mas, dessa vez, foi incluída entre os fatores a mutação S45F e foram denominados de baixo risco aqueles pacientes sem qualquer fator e de alto risco aqueles com um ou dois fatores. Evidenciou-se que o risco de os pacientes com um ou dois fatores apresentarem recorrência local após a cirurgia é 8,36 vezes maior do que aqueles sem qualquer fator (IC [2,87 – 24,6];  $p = 0,0001$ ).

As análises deste presente estudo demonstraram existir um determinado grupo com uma evolução claramente desfavorável em relação à recidiva local após o tratamento cirúrgico. No entanto, com esses achados

não é possível afirmar que se deva tratar esse grupo de pacientes de forma não cirúrgica, pois não se sabe como a doença não operada evoluiria nesse grupo.

Logo, considerando o comportamento incerto e ainda enigmático dos tumores desmoides e as novas abordagens de tratamento dessa doença, por exemplo a *espera e observação* (BONVALOT et al. 2008; FIORE et al. 2009; GRONCHI et al. 2013; BRIAND et al. 2014), o uso de AINES (JANINIS et al. 2003) e a terapia-alvo específica (GOUNDER et al. 2018; TOULMONDE et al. 2018), entende-se, neste presente estudo, que os pacientes com idade menor do que 31 anos, com tumores localizados nas extremidades, com diâmetro acima de 10 centímetros, que já tenham sido operados previamente, com mutação S45F e, principalmente, aqueles considerados, neste estudo, como de *alto risco*, devam ser monitorizados com muito cuidado em um primeiro momento (exames de imagem em curtos períodos de tempo). Se houver progressão lenta da doença, pode-se fazer uso de terapias medicamentosas e, caso a progressão não seja lenta, pode-se considerar a radioterapia e/ou a cirurgia. No entanto, se a cirurgia for proposta, deve-se objetivar a realização de uma cirurgia com margens livres, desde que não haja mutilação nem grande perda de função. Após a cirurgia, um seguimento muito próximo deve ser realizado, principalmente nos dois primeiros anos, e a atenção não deve ser minimizada antes dos cinco anos de pós-operatório. Tratamento adjuvante com a radioterapia pode ser cogitado, dependendo da qualidade das margens ou da situação de recorrência local.

Por fim, compreende-se que este estudo tem algumas limitações, como o número total de pacientes, o número de amostras sequenciadas e o fato de ter sido realizado em apenas uma instituição. Contudo, os achados estatísticos foram bastante significativos e relevantes. Talvez, um próximo passo seja realizar uma análise multicêntrica, coletando dados e amostras mais diversos e não relacionados a apenas uma instituição oncológica especializada. No entanto, sabe-se que, nesse tipo de estudo, é sempre mais difícil conseguir uma amostra homogênea. Neste presente estudo,

apesar de trazer uma amostra não muito grande (107 casos estudados e 71 amostras sequenciadas), é uma das maiores da literatura atual e uma das raras que utilizou sequenciamento de próxima geração em um grupo de pacientes homogêneos, todos esporádicos, tratados de forma cirúrgica, com seguimento mínimo para os pacientes não recidivados de 24 meses e com um dos maiores seguimentos médios da literatura vigente. Novos estudos prospectivos ainda deverão ser feitos a fim de melhor estudar se a presença ou não da mutação S45F realmente pode predizer não somente um maior risco de recidiva local, mas também uma evolução clínica possivelmente pior daqueles pacientes não operados.

## 6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nas condições do presente estudo permitem concluir o seguinte:

- 1 A mutação nos códons 41 e 45 do gene codificante da betacatenina ocorreu em 85,9% (a mutação no códon 41 foi de 46,5%, no códon 45 31% e dupla mutação (41 e 45) 8,4%) e 14,1% das amostras avaliadas pelo sequenciamento de próxima geração (NGS) não apresentaram mutações.
- 2 A mutação S45F e os tumores localizados nas extremidades foram fatores independentes para um maior risco de recidiva no modelo multivariado.
- 3 Pacientes considerados de alto risco (um ou dois fatores) podem apresentar até oito vezes mais risco de recidiva que os demais casos.
- 4 A média dos valores da fração de alelo variante na amostra global foi 16,54%. Apesar de os pacientes com frequência alélica acima de 10% terem apresentado uma tendência ao pior prognóstico, não houve significância estatística para estabelecer tal correlação.
- 5 Foi identificada uma mutação no gene *APC* (c.7698\_7702delAACTG, p.Thr2567Lysfs\*14) em um dos tumores negativos para mutação em *CTNNB1*, que pode representar uma variante germinativa de um caso de FAP não diagnosticado.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas AE, Deschamps C, Cassivi SD, et al. Chest-wall desmoid tumours: results of surgical intervention. **Ann Thorac Surg** 2004, 78:1219-23.

[ACS] American Cancer Society. **Cancer Facts and Figures 2018**. Available from: <URL:<http://www.cancer.org/>> [2018 dez 12].

Aitken SJ, Presneau N, Kalimuthu S, et al. Next-generation sequencing is highly sensitive for the detection of beta-catenin mutations in desmoid-type fibromatoses. **Virchows Arch** 2015; 467:203-10.

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

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

Bauernhofer T, Stoger N, Schmid M, et al. Sequential treatment of recurrent mesenteric desmoid tumour. **Cancer** 1996, 77:1061-65.

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

Berra CM, Torrezan GT, Paula CA, Hsieh R, Lourenco SV, Carraro DM. Use of uracil-DNA glycosylase enzyme to reduce DNA-related artifacts from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues in diagnostic routine. **Appl Cancer Res** 2019; Artigo aceito.

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

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

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

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

Butz S, Stappert J, Weissig H, Kemler R. Plakoglobin and beta-catenin: distinct but closely related. **Science** 1992; 257:1142-44.

Cates JMM, Stricker TP. Surgical resection margins in desmoid-type fibromatosis: a critical reassessment. **Am J Surg Pathol** 2014; 38:1707-14.

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

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

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

Colombo C, Miceli R, Le Pe\_choux C, et al. Sporadic extra-abdominal wall desmoid-type fibromatosis: surgical resection can be safely limited to a minority of patients. **Eur J Cancer** 2015; 51:186-92.

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

Cox DR. Regression models and life-tables. **J Royal Statistical Society Series B (Methodological)** 1972; 34:187-220.

Crago AM, Denton B, Salas S, et al. A prognostic nomogram for prediction of recurrence in desmoid fibromatosis. **Ann Surg** 2013; 258:347-53.

Crago AM, Chmielecki J, Rosenberg M, et al. Near universal detection of alterations in CTNNB1 and Wnt pathway regulators in desmoid-type fibromatosis by whole-exome sequencing and genomic analysis. **Genes Chromosomes Cancer** 2015; 54:606–15.

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

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

Desai A, Jere A. Next-generation sequencing: ready for the clinics? **Clin Genet** 2012; 81:503-10.

Dômont J, Salas S, Lacroix L, et al. High frequency of beta-catenin heterozygous mutations in extra-abdominal fibromatosis: a potential molecular tool for disease management. **Br J Cancer** 2010; 102:1032-6.

Duggal A, Dickinson IC, Sommerville S, Gallie P. The management of extra-abdominal desmoid tumours. **Int Orthop** 2004 28:252-6.

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

Enzinger FM, Weiss SW. **Soft tissue tumors**. 6<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Elsevier; 2014a. General considerations; p.1-10.

Enzinger FM, Weiss SW. **Soft tissue tumors**. 6<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Elsevier; 2014b. Borderline and malignant fibroblastic / myofibroblastic tumors; p.288-340.

Escobar C, Munker R, Thomas JO, Li BD, Burton GV. Update on desmoid tumors. **Ann Oncol** 2012; 23:562-9.

Faulkner LB, Hajdu SI, Kher U, et al. Pediatric desmoid tumour: retrospective analysis of 63 cases. **J Clin Oncol** 1995; 13:2813-8.

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

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

Goepfert H, Cangir A, Ayala AG, Eftekhari F. Chemotherapy of locally aggressive head and neck tumors in the pediatric age group: desmoid fibromatosis and nasopharyngeal angiofibroma. **Am J Surg** 1982; 144:437-44.

Goldblum J, Fletcher JA. Desmoid-type fibromatoses. In: Fletcher CDM, Unni KK, Mertens F, editors. **Pathology and genetics of tumours of soft tissue and bone**. Lyon: IARC Press 2002. p.83-4.

Goy BW, Lee SP, Eilber F, et al. The role of adjuvant radiotherapy in the treatment of resectable desmoid tumours. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 1997; 39:659-65.

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

Gounder MM, Mahoney MR, Van Tine BA, et al. Sorafenib for advanced and refractory desmoid tumors. **N Engl J Med** 2018; 379:2417-28.

Grambsch PM, Therneau TM. Proportional hazards tests and diagnostics based on weighted residuals. **Biometrika** 1994; 81:515-26.

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

Gronchi A, Colombo C, Le Péchoux C, et al. Sporadic desmoid-type fibromatosis: a stepwise approach to a non-metastasising neoplasm--a position paper from the Italian and the French Sarcoma Group. **Ann Oncol** 2013; 25:578-83.

He XDD, Zhang YBB, Wang L, et al. Prognostic factors for the recurrence of sporadic desmoid-type fibromatosis after macroscopically complete resection: analysis of 114 patients at a single institution. **Eur J Surg Oncol** 2015; 41:1013-9.

Hosalkar HS, Torbert JT, Fox EJ, et al. Musculoskeletal desmoid tumors. **J Am Acad Orthop Surg** 2008; 16:188-98.

Huang K, Wang CM, Chen JG, et al. Prognostic factors influencing event-free survival and treatments in desmoid-type fibromatosis: analysis from a large institution. **Am J Surg** 2014; 207:847-54.

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

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

Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. **J Am Statist Assoc** 1958; 53:457-81.

Katsanis SH, Katsanis N. Molecular genetic testing and the future of clinical genomics. **Nat Rev Genet** 2013; 14:415-26.

Kempler R. From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion. **Trends Genet** 1993; 9:317-21.

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

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

Kinzbrunner B, Ritter S, Domingo J, Rosenthal CJ. Remission of rapidly growing desmoid tumours after tamoxifen therapy. **Cancer** 1983, 52:2201-4.

Klein WA, Miller HH, Anderson M, DeCosse JJ. Use of indomethacin, sulindac, and tamoxifen for the treatment of desmoid tumours associated with familial polyposis. **Cancer** 1987; 60:2863-8.

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

Kotilingam D, Lazar AJF, Pollock RE, Lev D. Desmoid tumor: a disease opportune for molecular insights. **Histol Histopathol** 2008; 23:117-26.

Lausen B, Schumacher M. Maximally selected rank statistics. **Biometrics** 1992; 48:73-85.

Lazar AJF, Tuvin D, Hajibashi S, et al. Specific mutations in the  $\beta$ -Catenin gene (CTNNB1) correlate with local recurrence in sporadic desmoid tumors. **Am J Pathol** 2008; 173:1518-27.

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

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

Lev D, Kotilingam D, Wei C, et al. Optimizing treatment of desmoid tumors. **J Clin Oncol** 2007; 25:1785-91.

Lewis JJ, Boland PJ, Leung DHY, Woodruff JM, Brennan MF. The enigma of desmoid tumours. **Ann Surg** 1999; 229:866-73.

Margulies M, Egholm M, Altman WE, et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. **Nature** 2005; 437:376-80.

McCrea PD, Turck CW, Gumbiner B. A homolog of the armadillo protein in *Drosophila* (plakoglobin) associated with E-cadherin. **Science** 1991; 254:1359-61.

Meazza C, Bisogno G, Gronchi A, et al. Aggressive fibromatosis in children and adults. **Cancer** 2010; 116:233-40.

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

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

Mullen JT, Delaney TF, Kobayashi WK, et al. Desmoid tumor: analysis of prognostic factors and outcomes in a surgical series. **Ann Surg Oncol** 2012; 19:4028-35.

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

Mushriq AJ, Magdalene A, Benjamin A. Optimal therapy for desmoid tumors: current options and challenges for the future. **Expert Rev Anticancer Ther** 2015; 15:1443-58.

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

Nishisho I, Nakamura Y, Miyoshi Y, et al. Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. **Science** 1991; 253:665-9.

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

Nusse R, Varmus HE. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. **Cell** 1982; 31:99-109.

Overhaus M, Decker P, Fischer HP, Textor HJ, Hirner A. Desmoid tumours of the abdominal wall: a case report. **World J Surg Oncol** 2003; 1:11.

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

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

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

Posner MC, Shiu MH, Newsome JL, Hadju SI, Gaynor JJ, Brennan MF. The desmoid tumour: not a benign disease. **Arch Surg** 1989 124:191-6.

Pritchard DJ, Nascimento AG, Peterson IA. Local control of extraabdominal desmoid tumours. **J Bone Joint Surg Am** 1996; 78:848-54.

Raney RB Jr, Evans A, Granowetter L, Schnauffer L, Uri A, Littman P. Nonsurgical management of children with recurrent or unresectable fibromatosis. **Pediatrics** 1987; 79:394-398.

Raney RB Jr. Chemotherapy for children with aggressive fibromatosis and Langerhan's cell histiocytosis. **Clin Orthop** 1991 262:58-63.

Rao BN, Horowitz ME, Parham DM, Etcubanas EE, et al. Challenges in the treatment of childhood fibromatosis. **Arch Surg** 1987; 122:1296-8.

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

Rock MG, Pritchard DJ, Reiman HM, Soule EH, Brewster RC. Extra-abdominal desmoid tumors. **J Bone Joint Surg Am** 1984; 66:1369-74.

Rubinfeld B, Souza B, Albert I, et al. Association of the APC gene product with beta-catenin. **Science** 1993; 262:1731-4.

Salas S, Chibon F, Noguchi T, et al. Molecular characterization by array comparative genomic hybridization and DNA sequencing of 194 desmoid tumors. **Genes Chromosomes Cancer** 2010; 49:560-8.

Salas S, Dufresne A, Bui B, et al. Prognostic factors influencing progression-free survival determined from a series of sporadic desmoid tumors: A wait-and-see policy according to tumor presentation. **J Clin Oncol** 2011; 29:3553-8.

Salto-Tellez M, Gonzalez de Castro D. Next-generation sequencing: a change of paradigm in molecular diagnostic validation. **J Pathol** 2014; 234:5-10.

Santos GAC, Cunha IW, Rocha Santos GAC, et al. Evaluation of estrogen receptor alpha, estrogen receptor beta, progesterone receptor, and cKIT expression in desmoids tumors and their role in determining treatment options. **Bio Science Trends** 2010; 4:25-30.

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

Schoenfeld D. Partial residuals for the proportional hazards regression model. **Biometrika** 1982; 69:239-41.

Shendure J, Porreca GJ, Reppas NB, et al. Accurate multiplex polony sequencing of an evolved bacterial genome. **Science** 2005; 309:1728-32.

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

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

Signorini S, Frattini M, Negri T, et al. Cyclooxygenase-2 and platelet-derived growth factor receptors as potential targets in treating aggressive fibromatosis. **Clin Cancer Res** 2007; 13:5034-40.

Sinha A, Tekkis PP, Gibbons DC, et al. Risk factors predicting desmoid occurrence in patients with familial adenomatous polyposis: a meta-analysis. **Colorectal Dis** 2011; 13:1222-9.

Sorensen A, Keller J, Nielsen OS, Jensen OM. Treatment of aggressive fibromatosis: a retrospective study of 72 patients followed for 1-27 years. **Acta Orthop Scand** 2002; 73:213-9.

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

Sportiello DJ, Hoogerland DL. A recurrent pelvic desmoid tumour successfully treated with tamoxifen. **Cancer** 1991; 67:1443-6.

Stout AP. Juvenile fibromatoses. **Cancer** 1954, 7:953-971.

Su LK, Vogelstein B, Kinzler KW. Association of the APC tumor suppressor protein with catenins. **Science** 1993; 262:1734-7.

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

Toulmonde M, Ray-Coquard CC, Pulido M, et al. DESMOPAZ pazopanib (PZ) versus IV methotrexate/vinblastine (MV) in adult patients with progressive desmoid tumors (DT) a randomized phase II study from the French Sarcoma Group. **J Clin Oncol** 2018; 36(15 suppl):11501. (Presented at 54<sup>th</sup> Annual Meeting, 01 a 05 de junho de 2018, Chicago, Illinois-USA]

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

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

van Broekhoven DL, Grünhagen DJ, den Bakker MA, van Dalen T, Verhoef C. Time trends in the incidence and treatment of extra-abdominal and abdominal aggressive fibromatosis: a population-based study. **Ann Surg Oncol** 2015a; 22:2817-23.

van Broekhoven DLM, Verhoef C, Grünhagen DJ, et al. Prognostic value of CTNNB1 gene mutation in primary sporadic aggressive fibromatosis. **Ann Surg Oncol** 2015b; 22:1464-70.

Waddell WR, Kirsch WM. Testolactone, suldinac, warfarin, and vitamin K1 for unresectable desmoid tumours. **Am J Surg** 1991; 161:416-21.

Weiss SW, Goldblum JR. Enzinger and Weiss's soft tissue tumors. 4<sup>th</sup> ed. Mosby St Louis; 2001. Fibromatoses; p.309-46.

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

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

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

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

Yost SE, Smith EN, Schwab RB, et al. Identification of high-confidence somatic mutations in whole genome sequence of formalin-fixed breast cancer specimens. **Nucleic Acids Res** 2012; 40:e107.

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

Zeng W-G, Zhou Z-X, Liang J-W, et al. Prognostic factors for desmoid tumor: a surgical series of 233 patients at a single institution. **Tumour Biol** 2014; 35:7513-21.

## 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, 13 de novembro de 2015.

Ao

**Dr. Ademar Lopes**

**Aluno: Fábio Fernando Elói Pinto (Mestrado).**

**Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 2091/15**

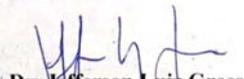
**“Avaliação das mutações no gene codificante da Beta - Catenina em pacientes portadores de tumor desmóide esporádico recidivado e sua associação com o prognóstico.”**

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antônio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 10/11/2015, após analisarem as respostas aos questionamentos realizados em reunião de 20/10/2015, aprovaram a realização do projeto e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

- Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos;
- Termo de Compromisso do Pesquisador com Resoluções do Conselho Nacional de Saúde;
- Termo de Dispensa do Consentimento Livre e Esclarecido;
- Declaração Sobre os Dados Coletados, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração Sobre Uso e Destino do Material Biológico, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração Sobre a Publicação dos Dados de Pesquisa Utilizando Amostras Fornecidas e Processadas pelo Biobanco do AC Camargo Cancer Center;
- Declaração de Infraestrutura e Instalações do Departamento de Anatomia Patológica;
- Declaração de Infraestrutura e Instalações do Núcleo de Ortopedia;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Anatomia Patológica;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Laboratório de Genômica e Biologia Molecular/CIPE;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Núcleo de Ortopedia;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Biobanco do AC Camargo Cancer Center;
- 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

**Anexo 2 - Lista dos 409 genes do painel Comprehensive Cancer Panel – Thermo Fisher.**

PDE4DIP	FANCA	CTNNA1	NF1	PRKDC	BCL2	TAL1	AKT3	MDM4
IL7R	RAF1	CYP2D6	BIRC5	ALK	NFKB2	JUN	TNFAIP3	CEBPA
MMP2	RARA	EPHA7	PALB2	EZH2	MLH1	CSF1R	NCOA4	GATA1
IRF4	ERG	STK36	MLL2	PSIP1	XPA	ETV1	CHEK2	ERCC2
AURKB	EXT1	GATA2	SEPT9	MSH6	HRAS	BCL2L1	CDH5	PBX1
TLR4	TRIM33	HOOK3	CDK12	WAS	EML4	BCL11B	FOXO1	PRDM1
ERBB4	NLRP1	ABL2	PIK3CG	PMS1	PTPRT	RNASEL	PKHD1	RPS6KA2
PAX7	MARK4	CCND2	WHSC1	IL2	RALGDS	BIRC2	MCL1	FN1
FH	MYD88	AKT1	GNAS	ERBB3	PIK3CB	NTRK3	MUTYH	MTR
SBDS	SMAD2	LAMP1	PLCG1	ATM	FOXO3	PIK3R2	FANCC	BUB1B
MTOR	NSD1	JAK2	MDM2	CDK8	MYH9	ABL1	PAX8	PHOX2B
ERCC5	PML	PIK3R1	DDB2	FAS	MAP2K4	KEAP1	IKBKE	PBRM1
SDHC	MAP3K7	GRM8	MLL	TAF1L	ITGB2	PLEKHG5	HIF1A	FANCG
LPP	FGFR1	CDKN2C	GUCY1A2	BCL11A	PPP2R1A	NF2	TRRAP	HSP90AA1
CKS1B	ERCC1	CYP2C19	CTNBN1	NUMA1	TET2	CRBN	SOCS1	ICK
ATRX	MET	MAF	AKT2	ESR1	ING4	DPYD	CDH20	MLLT10
TCF3	BAI3	SMO	MYCL1	ERBB2	IDH2	GPR124	EPHB4	RRM1
BLNK	NUP214	PDGFRA	MAP2K1	CREB1	APC	SSX1	ZNF521	MAGEA1
UBR5	BLM	BMPR1A	EGFR	NIN	SMAD4	TSC2	HLF	FANCD2
FOXP4	AXL	TIMP3	NFKB1	SAMD9	BCL6	FANCF	RET	PIM1
SUFU	CREBBP	ETV4	PAK3	SYK	CDKN2B	AR	RUNX1	TRIM24
NBN	SDHB	TGM7	IKBKB	ARNT	NPM1	CRKL	XPC	USP9X
WT1	ZNF384	TET1	IL21R	CASC5	FGFR4	CDH2	ARID1A	TRIP11
MPL	GATA3	MAPK1	BCL3	DDIT3	G6PD	DAXX	MRE11A	MAFB
KDR	MN1	FOXP1	MTRR	MARK1	AKAP9	KDM6A	MBD1	NFE2L2
TP53	MAP2K2	IGF2	LIFR	ADAMTS20	CDH11	FLT4	TNFRSF14	PMS2
NTRK1	SH2D1A	LRP1B	DICER1	CDK4	PIK3CD	ATF1	HCAR1	RNF2
PTEN	PTPRD	MAML2	SOX11	CDH1	CDKN2A	IL6ST	EPHB1	NOTCH4
CDK6	UGT1A1	EPHB6	CBL	EP400	BCL9	LTF	RB1	KLF6
AFF1	SGK1	TSC1	ITGB3	DDR2	MAPK8	FGFR3	CDC73	BIRC3
TCF7L1	TCF7L2	COL1A1	IKZF1	PLAG1	ERCC3	HSP90AB1	KAT6B	RNF213
PDGFRB	PDGFB	TLX1	DNMT3A	CD79B	PTCH1	NKX2-1	SOX2	PARP1
REL	PIK3C2B	ASXL1	TCL1A	DEK	RECQL4	MAGI1	FAM123B	ACVR2A
MLL3	TFE3	MYH11	CCNE1	FLI1	IGF1R	ETS1	SDHA	TOP1
EP300	JAK3	BRIP1	TBX22	CRTC1	TPR	TCF12	NRAS	POT1
MALT1	JAK1	AURKC	TAF1	IRS2	BCL10	RAD50	AURKA	AFF3
MITF	CSMD3	TNK2	CIC	SMARCB1	BRD3	ARID2	LPHN3	MYB
HNF1A	FGFR2	IDH1	CD79A	CMPK1	PGAP3	KRAS	VHL	FZR1
EPHA3	FLCN	PTPN11	BCR	DCC	SF3B1	BCL2L2	WRN	GDNF
SETD2	ITGA9	KDM5C	CCND1	CHEK1	TSHR	MYCN	DST	POU5F1
STK11	ERCC4	PAX3	RUNX1T1	SMARCA4	MYC	SYNE1	BAP1	FLT3
FLT1	KIT	PER1	SMUG1	XPO1	KAT6A	BRAF	ROS1	GNAQ
TGFB2	PRKAR1A	CARD11	PIK3CA	FOXL2	THBS1	PAX5	MSH2	GNA11
LCK	EXT2	PTGS2	IGF2R	LTK	RHOH	NCOA1	CYLD	PPARG
MEN1	NCOA2	SDHD	NOTCH2	MUC1	ATR	NOTCH1	SRC	FBXW7

## Apêndice 1 – Ficha de avaliação clínica

### Pesquisa Tumores Desmoides

#### Dados Gerais:

- 1- RGH: \_\_\_\_\_ 2-Tipo: \_\_\_\_\_
- 3- Nome: \_\_\_\_\_
- 4- Telefone resid.: \_\_\_\_\_
- 5- Telefone cel.: \_\_\_\_\_
- 6- País: \_\_\_\_\_
- 7- Procedência - Cidade: \_\_\_\_\_ UF: \_\_\_\_\_
- 8- Naturalidade – Cidade: \_\_\_\_\_ UF: \_\_\_\_\_
- 9- Endereço: \_\_\_\_\_
- 9.1- CEP: \_\_\_\_\_
- 10- Profissão: \_\_\_\_\_
- 11- Raça: **(1)** Branco **(2)** Negro **(3)** Pardo **(4)** Amarelo **(5)** Indígena **(9)** Ign
- 12- Sexo: **(1)** Masculino **(2)** Feminino
- 13- Data de nasc. \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_
- 14- Data de admissão no Hosp. \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_
- 15- Idade à admissão: \_\_\_\_\_
- 16- Data do último seguimento: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_
- 16.1- Situação clínica no último seguimento: **(1)** VSED (Vivo sem doença) **(2)** VCED (Vivo com doença) **(3)** VSOE (Vivo sem outras especificações) **(4)** MOCA (Morto por câncer) **(5)** MSEC (Morto sem câncer) **(6)** MOSOE (Morto sem outras especificações) **(7)** Perdido de vista (sem inf.) **(9)** Ign
- 16.2- Situação clínica no último seguimento - COMPLEMENTO: \_\_\_\_\_

#### Dados Iniciais:

- 17- Antecedentes familiares: **(0)** Não **(1)** Sim **(9)** Ign
- 17.1- Antecedentes familiares – Qual?: \_\_\_\_\_
- 18- Antecedentes pessoais: **(0)** Não **(1)** Sim **(9)** Ign
- 18.1- Antecedentes pessoais – Qual?: \_\_\_\_\_

**19-** Sinais/sintomas: **(0)** Não **(1)** Massa/aumento de volume **(2)** Dor **(3)** Restrição funcional **(4)** Incidentaloma **(5)** Outro tumor osseocartilaginoso/lesão óssea **(6)** Fratura patológica **(7)** Outros **(9)** Ign

**19.1-** Sinais/sintomas – Outros: \_\_\_\_\_

**20-** Trauma prévio: **(0)** Não **(1)** Sim **(9)** Ign

**21-** Tempo de acometimento: \_\_\_\_\_ meses

**22-** Tratamento prévio não oncológico: **(0)** Não **(1)** ATB **(2)** AINH **(3)** Analgésico **(4)** FST **(5)** Calor **(6)** Gelo **(7)** Drenagem cirúrgica **(8)** Outros **(9)** Ign

**22.1-** Tratamento prévio não oncológico – outros: \_\_\_\_\_

**23-** Tratamento pré-operatório prévio: **(0)** Não **(1)** Sim **(9)** Ign

**23.1-** Tratamento pré-operatório prévio – Qual?: **(1)** Seguimento prévio **(2)** QT **(3)** Rxt **(4)** Cirurgia **(5)** Outros **(9)** Ign

**23.1.1-** Tratamento pré-operatório prévio – Qual? – Outros: \_\_\_\_\_

**24-** Situação à admissão: **(0)** Intacto **(1)** Biópsia do **(2)** Operado **(3)** QT **(4)** Rxt **(5)** Outros **(9)** Ign

**24.1-** Situação à admissão - Outros: -----

**25-** Situação da admissão – *Status* da doença: **(1)** Doença loco-regional **(2)** Doença locorregional a distância **(3)** Doença a distância sem doença local **(4)** Recidiva locorregional **(5)** Outros **(9)** Ign

**25.1-** Situação da Admissão – *Status* da doença - Outros: \_\_\_\_\_

**26-** Localização: **(1)** Cabeça e pescoço **(2)** Úmero **(3)** Ulna **(4)** Rádio **(5)** Fêmur **(6)** Tíbia **(7)** Fíbula **(8)** Bacia **(9)** Coluna **(10)** Mão **(11)** Pé **(12)** Partes moles (braço) **(13)** Partes moles (antebraço) **(14)** Partes moles (coxa) **(15)** Partes moles (perna) **(16)** Partes moles (tronco/abdome) **(17)** Partes moles (mão) **(18)** Partes moles (pé) **(19)** Outros **(99)** Ign

**26.1-** Localização – Outros: \_\_\_\_\_

**27-** Lateralidade: **(0)** Direito **(1)** Esquerdo **(2)** Não se aplica **(9)** Ign

**28-** Localização Anatômica: **(0)** Não se aplica **(1)** Epífise **(2)** Metáfise **(3)** Diáfise **(9)** Ign

**29-** Número de cirurgias prévias: \_\_\_\_\_

**30-** TU primário – Onde foi encontrado: **(1)** Clínico **(2)** Radiológico **(3)** Anatomopatológico **(4)** Outros **(9)** Ign

**30.1-** TU primário – Onde foi encontrado – Outros: \_\_\_\_\_

**31-** Tamanho TU primário no maior eixo: \_\_\_\_\_

**32- Estádio T clínico: (0) T0– Não há evidências de TU primário (1) T1 – partes moles com até 5 cm (2) T2 – partes moles > 5 cm (3) Tx – Não avaliável (4) Não se aplica (9) Ign**

**33- Estádio N clínico: (0) N0 (1) N1 – LND regionais (2) Tx – Não avaliável (3) Não se aplica (9) Ign**

**34- Estádio M clínico: (0) M0 (1) Meta a distância (2) Mx – Não avaliável (3) Não se aplica (9) Ign**

**35- Tipo de tratamento: (0) Nada (1) Seguimento (2) Cirurgia (3) Radiofrequência (4) QT (5) Rxt (6) Outros (9) Ign**

**35.1.- Tipo de cirurgia - Outros:** \_\_\_\_\_

**35.1.1- Data da cirurgia:** \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**35.2- Radiofrequência – especificações:** \_\_\_\_\_

**35.3- QT (tipo/ciclos):** \_\_\_\_\_

**35.4- Rxt (dose/tipo):** \_\_\_\_\_

**35.5- Tipo de tratamento – Outros:** \_\_\_\_\_

### **Macroscopia/Histologia**

**36- Biópsia Prévia: (0) Não (1) Sim (9) Ign**

**36.1- Biópsia – Tipo: (1) Agulha grossa (2) Incisional (3) Outros (9) Ign**

**36.2- Biópsia – Tipo – Outros:** \_\_\_\_\_

**37- Antomopatológico:** \_\_\_\_\_

**38- Número da lâmina da biópsia:** \_\_\_\_\_

**39- Data do AP da biópsia:** \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**40- Antomopatológico:** \_\_\_\_\_

**41- Tamanho do TU no AP:** \_\_\_\_\_ cm

**42- Grau de malignidade: (0) Benigno (1) Baixo grau (2) Moderado/intermediário (3) Alto grau (9) Ign -| |**

**43- Invasão: (0) Não se aplica (1) Vascular (2) Linfática (3) Partes moles (4) Medular proximal/distal (9) Ign**

**44- Margens: (0) Não se aplica (1) Livres (2) Comprometidas (9) Ign**

**45- Número da lâmina:** \_\_\_\_\_ **46- Data do AP:** \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**47- Estadiamento AJCC – Sarcomas de tecidos moles: (1) Baixo grau (< 1 mitose/10 HPF (2) Intermediário grau (1-4 mitoses/10 HPF) (3) Alto grau (>5**

mitoses/10 HPF) **(4)** Alto grau (4A - invasão do osso, grande vaso ou nervo)  
**(5)** Alto grau (4B - metástase) **(9)** Ign

**Dados Epidemiológicos Pós-Cirurgia:**

**48-** Complicações pós-operatórias (30 dias): **(0)** Não **(1)** Infecção sítio Cirúrgico **(2)** Deiscência **(3)** Coleção **(4)** Necrose **(5)** Sistêmica **(6)** Óbito **(7)** Outros **(9)** Ign

**48.1-** Complicações pós-operatórias – Outros: \_\_\_\_\_

**Tratamentos Complementares:**

**49-** Tratam. complementar: **(0)** Não **(1)** Sim **(9)** Ign

**49.1-** Tratam. Complementar – Tipo: **(1)** QT **(2)** Rxt **(3)** Fisioterapia motora **(4)** Outros **(9)** Ign

**49.2-** QT (tipo/ciclos): \_\_\_\_\_

**49.3-** Rxt (dose/tipo): \_\_\_\_\_

**49.4-** Fisioterapia motora (número de sessões): \_\_\_\_\_

**49.5-** Tratam. Complementar - OUTROS: \_\_\_\_\_

**Recidivas/Tratamento de Recidivas:**

**50-** Local da metástase: **(0)** Não **(1)** Local **(2)** Pulmão **(3)** LND **(4)** Osso **(5)** Fígado **(6)** SNC **(7)** Outros **(9)** Ign

**50.1-** Local da metástase – Outros: \_\_\_\_\_

**51-** Data da recidiva (HACC): \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**52-** Data da detecção da 1º metástase: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**53-** Recidiva – Como foi identificado: **(1)** Clínico **(2)** Radiológico **(3)** Anatomopatológico **(4)** Outros **(9)** Ign

**53.1-** Recidiva – Como foi identificado/sintomas: **(1)** Dor **(2)** Aumento de volume **(3)** Exames de imagem de seguimento **(4)** Outros **(9)** Ign

**54-** Tamanho da recidiva: \_\_\_\_\_

**55-** Tratamento da recidiva: **(0)** Não tratou **(1)** Cirurgia **(2)** Rxt **(3)** QT **(4)** Outros **(9)** Ign

**55.1-** QT (tipo/ciclos): \_\_\_\_\_

**55.2-** Rxt (dose/tipo): \_\_\_\_\_

**55.3-** Tratam. cirúrgico da recidiva local: **(0)** Não **(1)** Ressec. sem amputação  
**(2)** Ressec. Com amputação **(3)** Irressecável **(4)** Outros **(9)** Ign

**53.3.1-** Tratam. cirúrgico da recidiva local - Outros: \_\_\_\_\_

**55.4-** Tratamento da recidiva - Outros: \_\_\_\_\_

**56-** Anatomopatológico: \_\_\_\_\_

**57-** Número da lâmina da recidiva: \_\_\_\_\_ **58-** Data do AP da  
recidiva: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**Dados Epidemiológicos Finais:**

**59-** Segundo TU primário: **(0)** Não **(1)** Sim **(9)** Ign

**60-** Segundo TU primário – Qual? Tratamento?: \_\_\_\_\_

**61-** Data do segundo TU primário: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**Apêndice 2** - Lista dos pacientes não portadores de mutação nos códons 41 e 45 do gene *CTNNB1*.

<b>Ordem de prioridade</b>	<b>RGH</b>	<b>AP</b>
<b>1o</b>	95041338	329020-B
<b>2o</b>	8087340	813728A
<b>3o</b>	12094530	1391023-AAE
<b>4o</b>	94045127	341899-A
<b>5o</b>	92034195	BA02-004916A
<b>6o</b>	90009010	266984A
<b>7o</b>	10058220	1010497AA
<b>8o</b>	90051890	276153
<b>9o</b>	7012446	1108487-AE
<b>10o</b>	99033046	B99-07025-A