

**IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÕES SOMÁTICAS EM  
ADENOCARCINOMA DE PRÓSTATA COM ESCORE  
DE GLEASON 7 E 8 E SUAS ASSOCIAÇÕES COM  
RECIDIVA BIOQUÍMICA**

**ISABELLA TANUS JOB E MEIRA**

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio  
Prudente para obtenção do título de Mestre  
em Ciências**

**Área de Concentração: Oncologia**

**Orientadora: Dra. Elisa Napolitano e Ferreira**

**Co-Orientadora: Dra. Dirce Maria Carraro**

**São Paulo**

**2017**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Meira, Isabella Tanus Job

**Identificação de mutações somáticas em adenocarcinoma de próstata com escore de Gleason 7 e 8 e suas associações com recidiva bioquímica** / Isabella Tanus Job e Meira – São Paulo, 2017.  
121p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientadora: Elisa Napolitano e Ferreira

Descritores: 1. Adenocarcinoma/Adenocarcinoma. 2. Neoplasias da Próstata/Prostatic Neoplasms. 3. Recidiva/Recurrence

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho às pessoas que estiveram ao meu lado e sempre me incentivaram a correr atrás dos meus objetivos, minha mãe Márcia, meu pai Beethoven, meu irmão Bruno e meus padrinhos Luís e Rosalina. Sem o apoio de vocês isso não seria possível.

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, **Dr<sup>a</sup> Elisa Napolitano e Ferreira**, pela confiança e dedicação a este trabalho, e acima de tudo pelo exemplo de pesquisadora e incentivadora. Tive muita sorte de ter uma pessoa tão inteligente e inspiradora como orientadora. Muito obrigada pelos ensinamentos, conversas e por sempre ter sido muito atenciosa comigo.

À minha co-orientadora, **Dr<sup>a</sup> Dirce Maria Carraro**, por ter me recebido em seu laboratório. Obrigada por dividir toda experiência e por ser um exemplo de pesquisadora.

**À minha família**, em especial aos meus pais e ao meu irmão, por terem me dado todo apoio em mais uma etapa da minha vida. Sem vocês nada disso seria possível. Obrigada pela paciência nos dias difíceis e pelos conselhos ao longo desses dois anos de mestrado. Vocês foram e sempre serão meus maiores inspiradores.

**Ao Dr. Gustavo Guimarães, à Dr<sup>a</sup> Isabela Werneck e a enfermeira de pesquisa Thais**, por terem ajudado na seleção dos casos utilizados neste trabalho.

Ao meu orientador da graduação, **Dr<sup>o</sup> Sandro José de Souza**, por me apoiar e incentivar na decisão de vir fazer o mestrado em São Paulo, seu apoio foi muito importante para minha decisão. Obrigada pelos “puxões de orelha”, pelos conselhos e todos os ensinamentos.

**Aos meus amigos do Laboratório de Genômica e Biologia Molecular**, que estiveram sempre ao meu lado. Obrigada pelos ensinamentos, pelas conversas e pela ajuda sempre que precisei. Em especial, gostaria de agradecer minha amiga **Kivvi Nakamura**, muito obrigada pela amizade, pela parceria, por me ouvir nos momentos difíceis e me aconselhar.

Agradeço ao **Renan Valieris**, ao **Dr<sup>o</sup> Rodrigo** e ao **José Eduardo Kroll** pelo auxílio com as análises de bioinformática.

Aos amigos que fiz durante este período, **Melissa Pizzi, Kivvi Nakamura, Flávia Lima, Felipe Ilelis e Felipe Fidalgo**, vocês fizeram este período do mestrado muito mais feliz. Obrigada pela parceria de vocês.

Ao meu amigo e namorado, **Igor Bernardo Andrade**, por estar comigo durante os momentos mais turbulentos. Obrigada por sempre me incentivar a não desistir.

**À equipe do Biobanco**, por todo auxílio e processamento das amostras.

**Aos funcionários da pós-graduação, do CIPE e da biblioteca, em especial a Suely**, por toda atenção e disponibilidade quando precisei.

**Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à CAPES** pelo suporte financeiro.

## RESUMO

Meira ITJ. **Identificação de mutações somáticas em adenocarcinoma de próstata com escore de Gleason 7 e 8 e suas associações com recidiva bioquímica.** São Paulo; 2017. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente]

O câncer de próstata é a neoplasia de maior incidência no gênero masculino, após o câncer de pele não melanoma, com índice de mais de 61 mil novos casos em 2016 (INCA). É um tipo de câncer com características histológicas e genéticas heterogêneas e multifocais. Em geral, é um tumor com comportamento indolente, podendo permanecer assintomático por anos. Já em outros casos, a doença pode progredir rapidamente, com o surgimento de metástases e levar o paciente ao óbito. Apesar do escore de Gleason ser um dos principais métodos de classificação desta neoplasia, sozinho ele não fornece informações precisas sobre o prognóstico, visto que pacientes com o mesmo escore podem apresentar comportamentos clínicos distintos, principalmente em tumores com escores intermediários. Com isso, a identificação de marcadores moleculares torna-se uma estratégia importante para melhor estratificação dos tumores indolentes dos mais agressivos, na avaliação de prognóstico, bem como na predição de resposta à terapia. Neste contexto, nossa proposta foi realizar o rastreamento de alterações somáticas em uma coorte de 43 casos de adenocarcinoma de próstata com escore de Gleason intermediário (escore de Gleason 7 e 8) que tenham ou não apresentado recidiva bioquímica. Para isso, foi realizado o sequenciamento das regiões codificadoras de 58 genes utilizando a plataforma *NextSeq (Illumina)* partindo de 35 amostras pareadas de DNA de tecido congelado do tumor e leucócitos ou tecido normal adjacente e 8 amostras de DNA de tecido congelado do tumor não pareadas. Identificamos 292 alterações somáticas, 226 classificadas como *missense* e 65 como LoF (perda de função), utilizando a ferramenta MuTect (Broad Institute). Em

média encontramos 7 alterações por caso, variando entre 0 a 91 alterações. Encontramos um maior número de SNVs (alterações pontuais) nos tumores classificados com escore de Gleason 3+4 em relação aos tumores com classificação 4+3, considerando a análise da porção tumoral utilizada no sequenciamento e não o escore da peça tumoral como um todo. Dos 58 genes presentes no painel customizado, 45 apresentaram ao menos uma alteração somática (~78%), e 35 genes apresentaram mutações em mais de uma amostra. Foi observado um enriquecimento de alterações somáticas em genes envolvidos com vias de remodelamento de cromatina. Não identificamos diferenças significativas entre o número e tipo de alterações somáticas nos tumores dos pacientes que apresentaram e não apresentaram recidiva bioquímica. Também não foram encontradas associações entre as alterações somáticas e outras características clínico-patológicas, sugerindo que o perfil heterogêneo deste tumor torna o tratamento personalizado e a busca de marcadores um grande desafio.

## SUMMARY

Meira ITJ. **[Identification of somatic mutations in prostate adenocarcinoma with Gleason score 7 and 8 and associations with biochemical recurrence]**. São Paulo; 2017. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente]

Prostate cancer is the most prevalent neoplasm in males after non-melanoma skin cancer, with a rate of more than 61,000 new cases in 2016 (INCA). This tumor shows multifocal and heterogenous histological and genetic characteristics. In general, it presents an indolent behavior, and may remain asymptomatic for years. In other cases, the disease can progress rapidly, with the appearance of metastases and lead to patient death. Although Gleason score is one of the most important classification system of this neoplasm, alone it does not provide precise information on prognosis, since patients with the same score can present different behaviors, especially in tumors with intermediate Gleason. Thus, the identification of molecular markers becomes an important strategy for stratification of indolent and more aggressive tumors, for prognosis evaluation, as well as for prediction of therapy response. In this context, our proposal was the screening of somatic mutations in a cohort of 43 cases of prostate adenocarcinoma with an intermediate Gleason score (7 and 8) that presented or not a biochemical recurrence. To do this, we sequenced the coding regions of 58 genes using the NextSeq (Illumina) platform using 35 paired DNA samples from frozen tissue and leukocytes or normal adjacent tissue and 8 DNA samples from unpaired tumors. We identified 292 somatic variants, 226 classified as missense and 65 as LoF (loss of function), using MuTect pipeline (Broad Institute). On average, we detected 7 alterations per tumor, ranging from 0 to 91 alterations. We detected a statistically significant higher number of SNVs (single nucleotide variants) in tumor with Gleason score 3+4 compared to 4+3, considering the classification of the tumor sample used for sequencing



and not the score of the tumor as a whole. Of the 58 genes in the custom panel, 45 were affected by at least one somatic alteration (~78%), and 35 of them presented mutations in more than one sample. In addition, we observed an enrichment of somatic mutations in genes involved with pathways related to chromatin remodeling. We did not observe statistically significant differences in the number or type of somatic alterations between tumors from patient that presented or not biochemical recurrence. In addition, we did not observe associations between somatic alterations and clinical and pathological characteristics, suggesting that the heterogeneous characteristic of this tumor challenges the identification of molecular markers and personalized treatment.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Localização da glândula prostática.....	2
<b>Figura 2</b>	Divisão anatômica da próstata.....	3
<b>Figura 3</b>	Histologia da glândula prostática.....	4
<b>Figura 4</b>	Distribuição dos cânceres mais incidentes estimados para 2016.....	6
<b>Figura 5</b>	Metodologia do sequenciamento na plataforma Illumina....	48
<b>Figura 6</b>	Seleção do genes inseridos no painel.....	56
<b>Figura 7</b>	Avaliação das bibliotecas.....	58
<b>Figura 8</b>	Gráfico de barras com a comparação entre os alinhadores utilizados no estudo.....	66
<b>Figura 9</b>	Diagrama de Venn – Comparação entre as duas metodologias utilizadas para a chamada de variantes.....	68
<b>Figura 10</b>	Imagens dos alinhamentos das sequências vistas pelo visualizador IGV.....	70
<b>Figura 11</b>	Box plot com a representação do número de alterações por amostra.....	73
<b>Figura 12</b>	Distribuição e avaliação das amostras com relação ao Escore de Gleason da peça cirúrgica.....	75

<b>Figura 13</b>	Box plot representando a distribuição de SNVs separadas de acordo com o Escore de Gleason da lâmina.....	77
<b>Figura 14</b>	Gráfico de barras representando o resultado obtido através do Teste de Fisher.....	78
<b>Figura 15</b>	Overview das variantes identificadas entre as amostras com e sem recidiva bioquímica.....	80
<b>Figura 16</b>	Distribuição dos genes alterados em mais de 10% das amostras.....	83
<b>Figura 17</b>	Gráficos de barras comparando entre os grupos com e sem recidiva.....	87

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

<b>Quadro 1</b>	Classificação inicial do Sistema de Gleason.....	13
<b>Quadro 2</b>	Classificação so Sistema de Gleason modificada ISUP 2005..	15
<b>Quadro 3</b>	Atualização da morfologia dos padrões de Gleason revisado em 2005.....	16
<b>Quadro 4</b>	Novo sistema de classificação histológica dos tumores de próstata.....	18
<b>Quadro 5</b>	Classificação TNM do CaP em vigor (2010).....	20
<b>Quadro 6</b>	Classificação TNM do CaP a ser implementada em 2018.....	21
<b>Quadro 7</b>	Avaliação as amostras tumorais utilizadas no estudo.....	36
<b>Quadro 8</b>	Avaliação das amostras de leucócitos utilizadas no estudo.....	38
<b>Quadro 9</b>	Avaliação das amostras de borda adjacente ao tumor.....	39
<b>Quadro 10</b>	Lista de genes selecionados para compor o painel customizado.....	41
<b>Quadro 11</b>	Programa de ciclos e temperaturas para amplificação das regiões de interesse por PCR.....	44
<b>Quadro 12</b>	Programa utilizado na reação de qPCR ( <i>KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix</i> ) para quantificação das bibliotecas.....	46
<b>Quadro 13</b>	Distribuição dos casos selecionados para o estudo.....	54

<b>Quadro 14</b>	Relação dos índices utilizados por amostra, quantificação e tamanho dos fragmentos das bibliotecas.....	58
<b>Quadro 15</b>	Número de alterações por gene e número de amostras alteradas.....	79
<b>Quadro 16</b>	Análise de enriquecimento de categorias utilizando os dados de ontologia ( <i>Gene Ontology</i> ).....	82
<b>Quadro 17</b>	Categorias enriquecidas no grupo sem recidiva bioquímica.....	88
<b>Quadro 18</b>	Número de alterações por gene separados por grupos com e sem recidiva.....	89
<b>Tabela 1</b>	Total de sequências geradas e mapeadas no genoma humano com a ferramenta BWA para cada amostra excluídas por terem sido super-representadas e pouco representada no sequenciamento, T11 e SG08, respectivamente.....	62
<b>Tabela 2</b>	Genes alterados em nosso estudo com a porcentagem de alteração em nossa casuística e na casuística do estudo de Fraser et al. 2017.....	82

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>AJCC</b>	American Joint Committee for Cancer
<b>BTRUS</b>	Biópsia transretal guiada por Ultrassom
<b>BWA</b>	Burrows Wheeler Aligner
<b>C-3D</b>	Conformacional 3D
<b>CaP</b>	Câncer de Próstata
<b>cGY</b>	Centigray
<b>cm</b>	Centímetro
<b>DNAg</b>	DNA genômico
<b>EG</b>	Escore de Gleason
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>Gb</b>	Gigabase
<b>GO</b>	Gene Ontology
<b>HPB</b>	Hiperplasia Prostática Benigna
<b>IGV</b>	Integrative Genomics Viewer
<b>INCA</b>	Instituto Nacional do Câncer
<b>InDel</b>	Inserção ou Deleção
<b>ISUP</b>	International Society of Urological Pathology
<b>LOF</b>	Loss of Function
<b>Mb</b>	Megabase
<b>mM</b>	Milimolar
<b>Ng</b>	nanograma
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>Pb</b>	Par de base
<b>PP</b>	Prostatectomia Parcial
<b>PR</b>	Prostatectomia Radical
<b>PSA</b>	Antígeno prostático específico
<b>SNV</b>	Single Nucleotide Variant
<b>TCGA</b>	The Cancer Genome Atlas
<b>TR</b>	Toque Retal

<b>TSCA</b>	TruSeq Custom Amplicon
<b>uL</b>	Microlitro
<b>VCF</b>	Variant Calling Files

# ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1	Glândula Prostática .....	1
1.2	Doenças da Próstata .....	4
1.2.1	Câncer de próstata (CaP).....	5
1.2.1.1	Epidemiologia do CaP .....	6
1.2.1.2	Rastreamento e diagnóstico do CaP.....	8
1.2.1.3	Classificação Histológica do CaP.....	13
1.2.1.5	Estadiamento do CaP .....	18
1.2.1.6	Tratamento do CaP .....	21
1.2.1.7	Aspectos genéticos e moleculares do CaP .....	25
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>32</b>
2.1	Objetivo Geral.....	32
2.2	Objetivos Específicos .....	32
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>33</b>
3.1	Casuística.....	33
3.2	Extração do DNA.....	34
3.3	Sequenciamento.....	40
3.3.1	Construção do painel.....	40
3.3.2	Construção das bibliotecas.....	42
3.3.2.1	Qualidade e quantificação do DNA inicial .....	42
3.3.2.2	Hibridização dos oligonucleotídeos .....	43
3.3.2.3	Remoção dos oligonucleotídeos não ligados .....	43
3.3.2.4	Extensão e ligação dos oligonucleotídeos ligados .....	43
3.3.2.5	Amplificação por PCR das regiões de interesse .....	44
3.3.2.6	Purificação dos produtos de PCR .....	45
3.3.3	Quantificação das bibliotecas por qPCR .....	45
3.3.4	Sequenciamento na plataforma NextSeq – Illumina.....	46



3.4	Análise de Bioinformática .....	49
3.4.1	Alinhamento das sequências.....	49
3.4.2	Chamada e anotação das variantes somáticas .....	50
3.4.3	Análise de vias e ontologia (KEGG e Gene Ontology) .....	52
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>53</b>
4.1	Seleção dos Pacientes .....	53
4.2	Seleção dos Genes e Customização do Painel.....	55
4.3	Sequenciamento das Amostras .....	57
4.3.1	Preparo das bibliotecas .....	57
4.4	Análise dos Dados de Sequenciamento e Identificação das Variantes Somáticas.....	60
4.4.1	Análise de mapeamento das sequências .....	60
4.4.2	Comparação entre dois pipelines para mapeamento e chamada de variantes .....	65
4.4.3	Perfil mutacional de tumores de próstata de escore de Gleason Intermediário.....	72
4.4.4	Perfil mutacional de tumores de próstata associado com recidiva Bioquímica .....	86
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>90</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>103</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS .....</b>	<b>104</b>

## **ANEXOS**

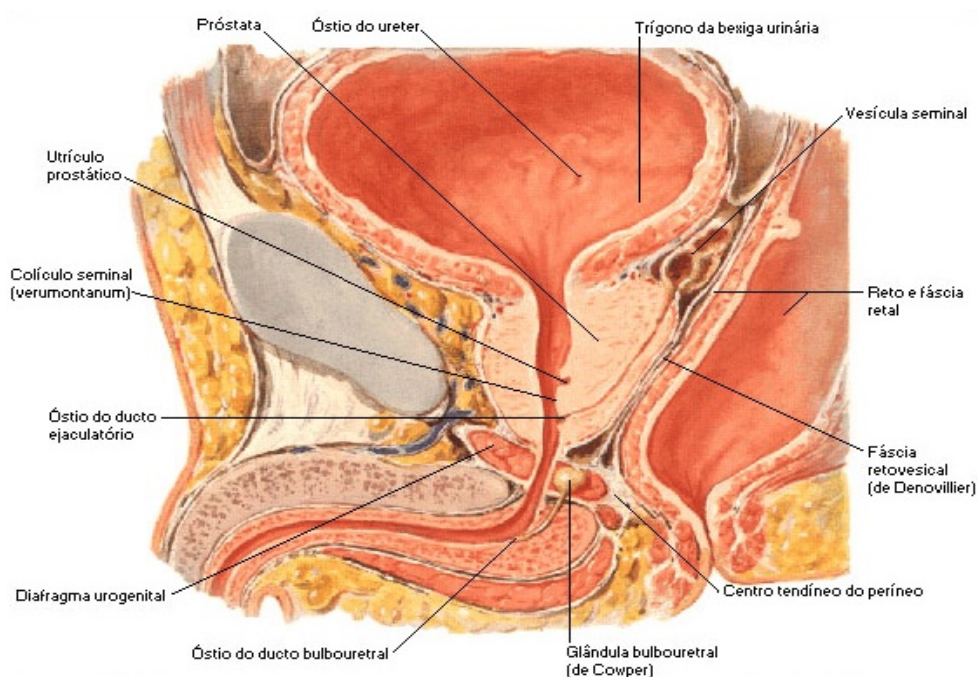
**Anexo 1** Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 GLÂNDULA PROSTÁTICA

A próstata é uma glândula exócrina do sistema reprodutor masculino, que possui forma de pirâmide invertida, onde sua base encontra-se encostada no colo da bexiga envolvendo a porção superior da uretra (**Figura 1**) (COAKLEY e HRICAK 2000). Em situações fisiológicas, esta glândula mede aproximadamente 4 centímetros (cm) de largura, 3 cm de altura, 2 cm de espessura, e pesa entre 15 e 250 gramas, e com o avanço da idade do homem ela passa a crescer cerca de 0,4 gramas por ano (Urologia on line 2000). Suas funções principais são produção, armazenamento e secreção de um fluido claro, alcalino, que constitui cerca de 50-70% do volume do fluido seminal, o qual é composto por espermatozoides e pelo fluido secretado pelas vesículas seminais (LIN et al. 2013).

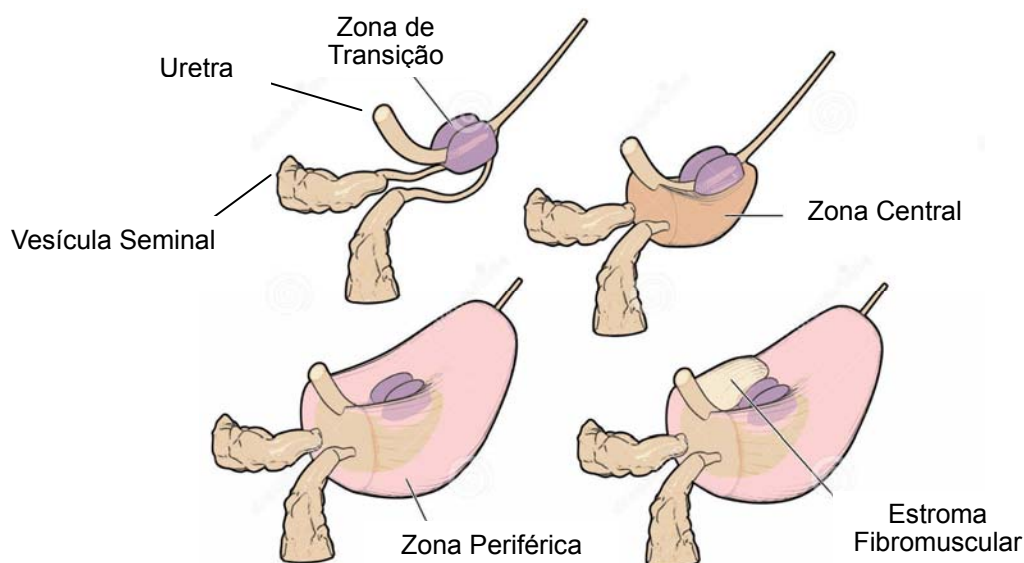
Histologicamente, a próstata é composta por elementos glandulares de histologia acinar e não glandulares, os quais são a uretra prostática e o estroma fibromuscular. Além disso, a parte glandular ainda se subdivide em dois componentes, os internos (glândulas periuretrais e zona de transição) e os externos (zona central e zona periférica) (RIFKIN et al. 1990).



Fonte: NETTER (2000).

**Figura 1** - Localização da glândula prostática.

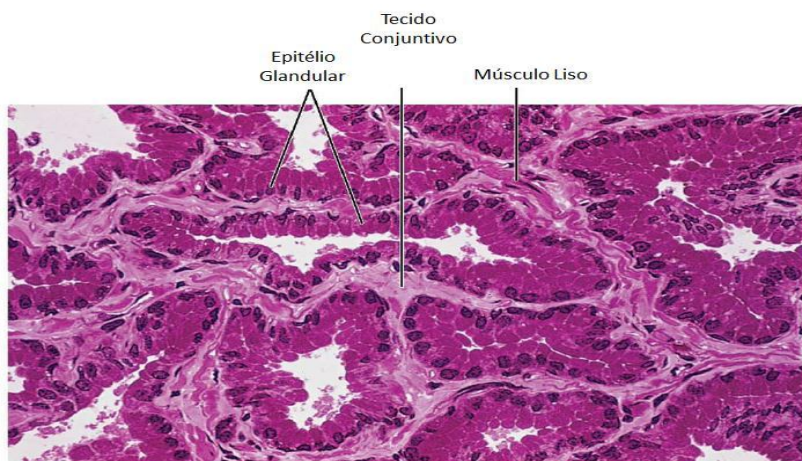
Com relação às zonas prostáticas, temos as seguintes divisões: a zona periférica, a qual encontra-se na região mais externa da próstata e que corresponde a 70-75% do volume glandular, sendo este o principal local de surgimento de tumores e inflamações; a zona de transição, que corresponde 5-10% do volume prostático, local onde se predomina o surgimento da hiperplasia prostática benigna (HPB); e a zona central, a qual representa cerca de 20-25% do volume glandular (**Figura 2**) (MCNEAL 1981; LEE et al. 2011; SELMAN 2011).



**Fonte:** Adaptado de <https://pt.dreamstime.com/ilustrao-stock-glandula-de-prostata-image61658231>

**Figura 2** - Divisão anatômica da próstata.

As glândulas que compõe a próstata são túbulo alveolares ramificadas, compostas de epitélio glandular do tipo cuboide simples, envolvidas por um estroma o qual é constituído por células musculares lisas, fibroblastos, miofibroblastos, vasos sanguíneos, nervos e matriz extracelular (**Figura 3**). Organizado em uma única camada, o epitélio prostático é constituído por células luminas diferenciadas, as quais produzem o antígeno prostático específico (PSA) e fosfatase alcalina, células tronco basais e células neuroendócrinas (OKADA et al. 1992).



**Fonte:** Adaptado de JUNQUEIRA e CARNEIRO (2004).

**Figura 3** - Histologia da glândula prostática. Imagem mostrando as glândulas túbulo alveolares ramificadas, com epitélio do tipo cúbico simples. Estroma de sustentação composto de tecido conjuntivo e muscular liso.

## 1.2 DOENÇAS DA PRÓSTATA

As patologias mais frequentes que ocorrem na próstata são: a prostatite com incidência de 12% em homens com menos de 50 anos de idade, a hiperplasia prostática benigna (HPB) com incidência de 56% na população Asiática e o câncer de próstata (CaP) com incidência de 28% na população masculina (XIA et al. 2012).

A prostatite é uma doença comum, caracterizada por causar irritações e obstruções urinárias, dores geniturinárias, pélvicas e retais, e que pode vir associada com disfunções eréteis. É uma síndrome de alta prevalência, na qual os pacientes apresentam diminuição na qualidade de vida e, mesmo após tratamento, a doença pode recorrer em alguns casos (LIANG et al. 2009). Apesar de alguns casos estarem relacionados com

infecções urinárias, muitos pacientes podem não apresentar infecções bacterianas, e, nestes casos, a prostatite pode estar relacionada à fatores imunológicos, químicos, devido à metabólitos urinários e genéticos (NICKEL 2000; WEIDNER et al. 2008).

A hiperplasia prostática benigna (HPB) é uma doença associada ao crescimento benigno da próstata. Grande parte dos casos de HPB ocorrem na zona de transição prostática (NICKEL 2008; XIA et al. 2013) e pode causar obstrução do fluxo da bexiga, levando a urgências urinárias, noctúria, esvaziamento incompleto da bexiga e fluxo urinário fraco (TSENG 2013).

Apesar de não haver uma associação bem estabelecida sobre a relação molecular e genética entre a HPB e a prostatite com o desenvolvimento e progressão do câncer de próstata, estudos mostram que o processo inflamatório crônico desenvolvido no decorrer destas doenças pode ser a via patogênica em comum entre elas (DENNIS e DAWSON 2002; NELSON et al. 2004; KÖNIG et al. 2004; DE NUNZIO et al. 2011).

### **1.2.1 Câncer de próstata (CaP)**



O CaP origina-se nas células epiteliais da glândula prostática, onde estas, na fase inicial, passam por transformações levando a um aumento da proliferação celular, acarretando na formação do tumor.

Apesar de ser um tipo de tumor que se desenvolve de forma gradual, este pode invadir órgãos adjacentes, como vesículas seminais, bexiga, uretra e reto, e em alguns casos mais avançados, a doença pode progredir

de forma rápida, invadindo órgãos mais distantes, caracterizando o processo de metástase (MACKINNON et al. 2009; JIN et al. 2011). Assim como em outros tumores sólidos, o CaP pode metastizar para fígado, pulmão, cérebro e principalmente para os ossos, sendo a principal causa de morte dos pacientes (aproximadamente 80% dos pacientes que vieram à óbito em decorrência do CaP, possuíam metástase óssea) (BUBENDORF et al. 2000).

### 1.2.1.1 Epidemiologia do CaP

O CaP é um tipo de câncer heterogêneo e multifocal (AIHARA et al. 1994). É a neoplasia mais comum no gênero masculino e a quarta mais comum em todo o mundo, exceto câncer de pele não melanoma (CENTER et al. 2012), com uma estimativa em 2016 de 180.890 novos casos e 26.120 mortes nos Estados Unidos (SIEGEL et al. 2016) e 61.200 novos casos no Brasil, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA) (Ministério da Saúde 2016) (**Figura 4**).

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%		
Próstata	61.200	28,6%	<b>Homens</b>		Mama feminina	57.960	28,1%		
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	8,1%			<b>Mulheres</b>		Cólon e Reto	17.620	8,6%
Cólon e Reto	16.660	7,8%					Colo do útero	16.340	7,9%
Estômago	12.920	6,0%					Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%
Cavidade Oral	11.140	5,2%					Estômago	7.600	3,7%
Esôfago	7.950	3,7%					Corpo do útero	6.950	3,4%
Bexiga	7.200	3,4%					Ovário	6.150	3,0%
Laringe	6.360	3,0%					Glândula Tireoide	5.870	2,9%
Leucemias	5.540	2,6%					Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%
Sistema Nervoso Central	5.440	2,5%					Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%

\*Números arredondados para múltiplos de 10.

Fonte: Ministério da Saúde (2016)

**Figura 4** - Distribuição dos cânceres mais incidentes estimados para 2016. Imagem ilustrativa dos dez tumores mais incidentes estimados para 2016, exceto câncer de pele não melanoma.

Os fatores de risco que contribuem com a alta incidência do CaP podem ser tanto genéticos quanto demográficos, como idade avançada, etnia, infecções e inflamações, dieta, suscetibilidade genética e principalmente histórico familiar (MACKINNON et al. 2009; AL OLAMA et al. 2014).

Dentre todos os homens diagnosticados com CaP, apenas 0,1% possui idade menor que 50 anos. Aproximadamente 85% dos casos são diagnosticados depois dos 65 anos e, na idade de 85 anos, o risco cumulativo varia entre 0,5% a 20% (PATEL 2008; GRÖNBERG et al. 1997). A incidência do CaP varia muito entre países e grupos étnicos diferentes. Os menores índices da doença são encontrados na Ásia, com uma incidência anual de 1,9 de novos casos por 100.000 da população (PATEL 2008), e os maiores índices são encontrados nos Estados Unidos, com uma incidência anual de 272 novos casos por 100.000 da população, principalmente afro-americanos (QUINN et al. 2002). Com relação à processos inflamatórios, alguns estudos epidemiológicos sugerem que infecções e inflamações ocasionadas por agentes infecciosos presentes tanto na via urinária, quanto transmitidos sexualmente, poderiam levar a uma transformação maligna do tecido prostático contribuindo com o desenvolvimento de prostatites e CaP (DENNIS e DAWSON 2002; DENNIS et al. 2002; PATEL 2008).

O risco de desenvolver a doença dos parentes de primeiro grau de homens portadores de câncer de próstata, é duas vezes maior do que a população geral (GOLDGAR et al. 1994; SCHAID 2004). Esse risco



aumenta mais de quatro vezes para parentes de primeiro grau de pacientes diagnosticados com a doença com idade menor que 60 anos (JOHNS e HOULSTON 2003). Além disso, estudos de famílias com casos de câncer de mama, mostraram que portadores masculinos de mutações germinativas no gene *BRCA2*, têm maiores riscos de desenvolver CaP, principalmente em idade precoce com parentes de primeiro grau acometidos (GOLDGAR et al. 1994; Breast Cancer Linkage Consortium 1999; KOMMU et al. 2004, CAVANAGH e ROGERS 2015).

Com relação à dieta, estudos relacionam o alto consumo de frutas, vegetais ricos em carotenoides como tomates e cenoura, legumes como soja, ervilha e feijão, vitaminas do tipo A, D e E, e minerais como selênio, com diminuição do risco de desenvolvimento do CaP. Por outro lado, um alto consumo energético total, com carne vermelha, gorduras e derivados de leite, pode levar a um aumento do risco de desenvolver CaP (CHAN et al. 2005).

#### **1.2.1.2 Rastreamento e diagnóstico do CaP**

Em geral, o tumor de próstata tem comportamento indolente, podendo permanecer assintomático por anos. O número de pacientes assintomáticos e não diagnosticados com esse tipo de câncer, é maior do que o número de pacientes com a doença já diagnosticada. No entanto, em alguns casos, a doença pode progredir rapidamente, com o surgimento de metástases e levar o paciente ao óbito (COLDMAN et al. 2003; MACKINNON et al. 2009).

O CaP é uma doença que pode ser rastreada de forma precoce por meio de métodos de triagem e preventivos, como o toque retal (TR) e a dosagem antígeno prostático específico sérico (PSA). Apesar de não existir um consenso entre os órgãos de saúde, é recomendável que homens a partir dos 50 anos de idade realizem os testes de triagem uma vez por ano, de forma a diminuir a incidência da doença avançada (Urologia on line 2000).

O TR é o teste mais utilizado na prática clínica. Apesar de suas limitações, pois apenas as porções posterior e lateral da próstata podem ser palpadas, é considerado um exame de alta especificidade (em torno de 94%), porém, de baixa sensibilidade (50%), com um valor preditivo entre 21% - 53% (PARKER et al. 1996; GREENLEE et al. 2001; GRUBB et al. 2008).

Na década de 1980, com a aprovação pelo FDA (do inglês, *Food and Drug Administration*) da implementação do exame do PSA (Antígeno Prostático Específico), a incidência de diagnóstico de câncer de próstata aumentou significativamente, com 90% dos casos sendo diagnosticados em estágio inicial (ILYIN et al. 2004).

O PSA é uma serina protease secretada pelas células epiteliais da próstata (BICKERS et al. 2009), e sua detecção em níveis séricos acima de 4 ng/mL pode indicar presença de um tumor, porém, por ser específico do tecido prostático e não do CaP, outros eventos podem causar o aumento sérico desta molécula, como idade avançada, HPB e prostatites (SCHALKEN et al. 2005). Devido a isso, quando pacientes com níveis de

PSA sérico entre 3 – 10 ng/mL realizam uma biópsia prostática, são observadas taxas de resultados negativos de aproximadamente 70- 80% (DJAVAN et al. 2000; HUGOSSON et al. 2004; MÄÄTTÄNEN et al. 2007). Por outro lado, cerca de 15% dos pacientes com PSA sérico abaixo de 4,0 ng/mL e sem alterações no TR, que foram submetidos a biópsia prostática, apresentavam CaP com classificação histológica avançada (PRYOR e SCHELLHAMMER 2002; THOMPSON et al. 2004).

Apesar da introdução da dosagem do PSA na rotina de diagnóstico ter levado de forma direta a uma diminuição da mortalidade de homens por CaP, muitos pacientes com tumores de baixa agressividade foram submetidos a tratamentos intensivos desnecessariamente, levando o paciente a um tratamento considerado excessivo (*National Cancer Institute*-NCI). Isso pôde ser observado a partir do estudo de SARDANA et al. (2008), o qual identificou que 30% dos tumores de pacientes submetidos à prostatectomia radical, foram classificados como pouco agressivos (SARDANA et al. 2008).

A dosagem do PSA total pode variar conforme diferentes aspectos relacionados ao paciente, como idade, peso, raça, como também aspectos relacionados à manipulação das amostras e calibração dos equipamentos (LILJA et al. 2008).

Até então, não está estabelecido um valor da concentração de PSA total que discrimine com segurança os CaP de alto e baixo risco (LU-YAO et al. 2008). De forma arbitrária, o valor de 4,0 ng/mL de PSA total é empregado como valor de corte no diagnóstico de CaP, porém, este valor

possui baixa especificidade (LILJA et al. 2008), visto que, homens com idade avançada, por possuírem uma próstata de maior tamanho, conseqüentemente também apresentam um maior valor na concentração de PSA total (VICKERS et al. 2007).

Com o intuito de melhorar a sensibilidade e especificidade, várias formas de utilização do PSA já foram propostas, como a estratificação do PSA por faixa etária (OESTERLING et al. 1993), razão do PSA pelo volume da próstata (densidade do PSA) (BENSON et al. 1992), variação do PSA no tempo (velocidade do PSA) (CARTER et al. 1992; SARDANA et al. 2008), razão do PSA livre pelo PSA total (%PSAL/PSAT) (PARTIN et al. 1996) e o tempo de duplicação do PSA (SCHMID 1995).

Se por um lado a dosagem do PSA para fins diagnósticos seja de baixa especificidade, sua medida como forma de acompanhamento dos pacientes submetidos a prostatectomia radical (PR) é de grande validade. Os pacientes que realizam a PR, ou seja, a cirurgia para retirada total da próstata, são acompanhados com exames de dosagem de PSA sérico a cada três meses. Espera-se que a primeira dosagem logo após a cirurgia (aproximadamente 45 dias após a cirurgia), apresente valores próximos a 0 ng/mL, devido a remoção da glândula produtora desta proteína. A detecção de uma concentração sérica acima de 0,2 ng/mL, em dosagens posteriores após a primeira dosagem, caracteriza a recidiva bioquímica da doença, a qual pode significar a presença de células tumorais, seja pela presença de tumor residual ou recidiva ou metástase da doença (PAPAREL et al. 2009). Aproximadamente 20-30% dos pacientes submetidos a este tratamento

apresentam recidiva bioquímica em 10 anos (HAN et al. 2003; SIMMONS et al. 2007).

Com toda essa atenção que a dosagem de PSA e o TR têm para a detecção do CaP, dependendo dos resultados destes exames, o paciente será encaminhado para realizar uma ultrassonografia transretal, a qual por sua vez, poderá mostrar a necessidade de se realizar uma biópsia transretal da próstata guiada por ultrassom (BTRUS). Neste caso, um fragmento da próstata é retirado para que seja realizada uma análise histopatológica do tecido, para obtenção de um diagnóstico.

Apesar de ser o método padrão, a biópsia guiada por ultrassonografia tem mostrado taxas elevadas de falsos negativos. Isto porque demonstrou-se que o risco cumulativo de se detectar CaP aumenta de forma significativa com biópsias repetidas, ou seja, pacientes submetidos a uma biópsia tiveram uma taxa de detecção de CaP de 34%, duas biópsias 50%, três biópsias 62% e quatro biópsias 68% (WELCH e BLACK 2010).

Com isso, diferentes métodos têm sido estudados para melhorar a questão da sensibilidade do ultrassom, como por exemplo, a utilização de maiores números de fragmentos por biópsia, aplicação do ultrassom transretal com *doppler* (FRAUSCHER et al. 2002) e utilização da ressonância magnética (HEIDENREICH et al. 2011).

### 1.2.1.3 Classificação Histológica do CaP

O sistema de classificação histológica do câncer de próstata é a medida mais utilizada como fator prognóstico desta doença (GLEASON 1966). Esta classificação foi desenvolvida entre 1966 e 1974 por Donald Gleason e colaboradores (GLEASON et al. 1974), e atribui valores de 1 a 5 aos padrões histológicos presentes nas lesões, discriminando assim, o grau de diferenciação glandular do tumor (do mais diferenciado para o menos diferenciado) (**Quadro 1**). A partir desta análise, é realizado o cálculo do escore de Gleason, o qual trata-se da soma do padrão histológico mais frequente (primário) com o segundo padrão mais frequente (secundário), podendo variar, portanto, de 2 a 10 (GLEASON et al. 1974; CHAN et al. 2000). Quanto ao prognóstico, tumores classificados com escore de Gleason de 3 a 6 apresentam bom prognóstico, enquanto tumores com escore de 8 a 10 são caracterizados como de mau prognóstico, levando a uma menor sobrevida do paciente (D'AMICO et al. 1998).

#### Quadro 1 – Classificação inicial do Sistema de Gleason

Classificação Inicial do Sistema de Gleason (1966-1977)
Padrão 1: glândulas bem diferenciadas, pequenas, unidas e circunscritas
Padrão 2: glândulas parecidas com padrão 1, porém com variação moderada de forma e tamanho; padrão cribriforme pode estar presente, essencialmente circunscrita, mas com perda de organização
Padrão 3: glândulas com tamanho e forma irregulares (papilares ou cribriformes), podem ser encontradas invadindo o estroma; essencialmente a borda é lisa e arredondada em torno do tumor
Padrão 4: Células grandes e claras com padrão de crescimento e infiltrado difuso; glândulas não separadas
Padrão 5: glândulas com pouca ou nenhuma diferenciação celular, podem aparecer como massas sólidas ou crescimento difuso

**Fonte:** GLEASON et al. (1974)

Em 1960, ano de desenvolvimento inicial do sistema de graduação de Gleason, não havia nenhum outro sistema de triagem para este tipo de tumor, exceto o exame do TR, visto que a dosagem de PSA sérico ainda não havia sido descoberta. Sendo assim, a coorte de pacientes utilizada para desenvolvimento desta classificação inicial, era composta principalmente por pacientes com doença localmente ou extra-prostaticamente avançada (86% dos homens selecionados). Além disso, outros aspectos como, por exemplo, a metodologia de obtenção de tecido por biópsia, a falta de frequência com que cirurgias de prostatectomia radical eram realizadas e dificuldades em descrever e classificar novas variações de adenocarcinoma de próstata, levaram à necessidade da atualização desta classificação.

Diante de todos esses pontos, em 2005, foi realizada uma convenção da Sociedade Internacional de Patologia Urológica (ISUP, do inglês, *International Society of Urological Pathology*) com o objetivo de tentar elucidar determinadas questões para tornar a classificação de Gleason mais precisa (EPSTEIN et al. 2005).

De acordo com as novas atualizações histológicas de cada padrão (**Quadro 2**), os casos classificados com escore de Gleason 1+1=2, não deveriam ser diagnosticados e sim reportados como adenomatose atípica (lesão benigna), exceto em raros casos com a presença de nódulos de ácinos circunscritos, estreitamente unidos, arredondados a ovalados de tamanho médio; escores de Gleason 3 e 4 deveriam ser raramente diagnosticados em biópsia por agulhamento, isso porque com este método,

não é possível verificar toda a borda da lesão e determinar se esta é circunscrita, subestimando a classificação do tumor. Além disso, em tumores de alto grau, os padrões de baixo grau deveriam ser ignorados caso estivessem em menos de 5% da área do tumor; padrões terciários deveriam ser relatados principalmente em casos de biópsia por agulhamento. O padrão de Gleason 5, apesar de ser encontrado tipicamente comedonecrose, pode apresentar regiões de necrose com forma cribriforme, que por si só podem ser referentes ao padrão 4. Sendo assim, para este padrão é preciso que a definição e identificação de comedonecrose seja feita de forma cuidadosa, para definir o padrão 5 da lesão (EPSTEIN et al. 2005).

#### **Quadro 2 - Classificação do Sistema de Gleason Modificada ISUP 2005**

Classificação Modificada do Sistema de Gleason (2005)
Padrão 1: nódulo circunscrito, ovalado, uniforme; ácinos de tamanho médio
Padrão 2: parecido com padrão 1, nódulos circunscritos, glândulas vagamente dispostas, não tão uniformes quanto padrão 1, não há padrão cribriforme; pode haver infiltração
Padrão 3: glândulas menores do que as observadas nos padrões anteriores, variação de forma e tamanho, nódulos cribriformes e levemente circunscritos; pode haver infiltração
Padrão 4: glândulas microacinares fundidas com glândulas malformadas, glândulas cribriformes grandes com borda irregular
Padrão 5: nenhuma diferenciação glândular, composta por cordões de células únicas, comedocarcinoma com necrose central circundadas por massas sólidas, papilares e cribriformes

Em 2014, uma nova conferência foi realizada com o objetivo de atualizar o sistema de graduação do CaP, revisado em 2005. Vários pontos



foram discutidos de forma consensual em relação à morfologia dos padrões de Gleason (**Quadro 3**), e os principais pontos atualizados foram: glândulas cribriformes e glomerulóides devem ser classificadas como padrão de Gleason 4; graduação de carcinomas mucinosos devem ser baseados em seu padrão de crescimento e classificados como padrão de Gleason 4; carcinomas intraductais com ausência de carcinomas invasivos não devem ser graduados e sim um comentário em relação à sua agressividade deve ser adicionado no laudo; em casos de “*borderline*” entre padrões 3 e 4, o padrão de menor valor deverá ser favorecido (PIERORAZIO et al. 2013; EPSTEIN et al. 2013).

**Quadro 3** - Atualização da morfologia dos padrões de Gleason revisado em 2014.

<b>Classificação Modificada do Sistema de Gleason (2014)</b>	
Padrão 1:	Ácinos médios; nódulo circunscrito, ovalado, uniforme
Padrão 2:	Parecido com padrão 1, porém não tão uniformes, sem padrão cribriforme
Padrão 3:	Ácinos menores e ramificados, variação de formas; pode haver infiltração
Padrão 4:	Ácinos cribriformes fusionados e mal formados; diagnóstico em 10x de aumento
Padrão 5:	Ausência de diferenciação glandular, presença de "rosetas", cilindros e comedonecrose

Apesar das mudanças realizadas, o sistema de graduação de Gleason ainda possui deficiências, como por exemplo, um tumor que tem como classificação um escore de Gleason 6, em uma escala de variação de 2 a 10, implica em um prognóstico intermediário, levando a uma impressão

de ser um tumor com comportamento mais agressivo, o que na maioria das vezes, não é o caso.

O grupo de tumores com escore de Gleason 7 apresentam diferentes respostas frente ao mesmo tratamento, na maioria das vezes este é a PR, resultando em uma evolução inexata em relação à recidiva da doença. Além disso, tumores com escore de Gleason 7 agrupam em um mesmo escore os casos 3+4 e 4+3, apesar de alguns estudos mostrarem prognósticos distintos entre esses (LAU et al. 2001; RASIAH et al. 2003; BURDICK et al. 2009). A diferença entre os subtipos é pequena e o mesmo caso pode ser classificado de forma distinta dependendo do profissional que realizou a análise, dificultando na tomada de decisão em relação à escolha do melhor tratamento, tendo como consequência direta no número de casos de recidiva bioquímica da doença (CHAN et al. 2000; RASIAH et al. 2003).

Sendo assim, um novo sistema de graduação do tumor de próstata foi proposto em 2014, o qual baseia-se na classificação de 5 grupos distintos em relação ao prognóstico da doença. Espera-se com a adoção do novo sistema de graduação obter uma estratificação mais acurada dos tumores, podendo levar a uma redução do tratamento excessivo de pacientes com tumores pouco agressivos. O novo sistema de graduação (**Quadro 4**), o qual seria um sistema de categorização mais simples variando de 1 a 5, (sendo 1 o menor grau), tem sido aceito pela Organização Mundial de Saúde-OMS e a partir de 2016 deverá ser usado juntamente com a classificação de Gleason (EPSTEIN et al. 2015).

**Quadro 4** - Novo sistema de classificação histológica dos tumores de próstata

<b>Nova Classificação dos tumores de Próstata</b>		
Grupo 1	EG ≤ 6	Glândulas discretas e bem formadas
Grupo 2	EG 3+4	Glândulas predominantemente bem formadas, poucas cribriformes
Grupo 3	EG 4+3	Predominantemente glândulas pouco formadas, cribriformes, pouco componente bem formado
Grupo 4	EG 8	Apenas glândulas mal formadas, fusionadas ou cribriforme OU glândulas bem formadas com pouco componente sem glândulas OU falta de glândulas com menor componente de glândulas bem formadas
Grupo 5	EG 9-10	Poucas glândulas em formação, pode haver necrose, com ou sem glândulas cribriformes

Legenda: EG – Escore de Gleason

### 1.2.1.5 Estadiamento do CaP

O estadiamento clínico possibilita prognosticar a extensão da doença e, conseqüentemente, direcionar quanto as opções terapêuticas mais viáveis.

Os parâmetros utilizados para realizar o estadiamento clínico deste tipo de tumor são o TR, dosagem do PSA sérico, grau tumoral, imagens radiológicas e cintilográficas, e em alguns casos linfadenectomia pélvica. Além de auxiliar em relação ao melhor tratamento terapêutico, estes dados podem prever mudança de grau tumoral, presença de doença extracapsular, margens cirúrgicas, invasão de vesículas seminais, comprometimento linfonodal e tempo para recorrência da doença (WEIN 2007).

O estágio de um tumor reflete não somente na taxa de crescimento e extensão da doença, como também que tipo de tumor e sua relação com o paciente. O TNM é a classificação mais utilizada, quando fala-se em estadiamento, e foi adotada em 1975 pela AJCC (do inglês, *American Joint Committee for Cancer*). Este sistema baseia-se na extensão anatômica da doença, levando em consideração características do tamanho do tumor primário (T), dos linfonodos acometidos relacionados com a cadeia de drenagem linfática do órgão ao qual o tumor está localizado (N) e a presença ou não de metástase à distância (M). Além disso, esses parâmetros podem receber graduações numéricas (T0 a T4; N0 a N1 e M0 a M1) e alfabéticas (a, b, c) e “X” quando a categoria não pode ser avaliada. Essas graduações, numéricas e alfabéticas, expressam a evolução do tumor e dos linfonodos comprometidos (Ministério da Saúde 2017a e b). Estadiar a doença é importante para categorizar o grau de severidade, estimar prognóstico, guiar na escolha do tratamento e auxiliar na troca de informações dos pacientes entre médicos e pesquisadores.

A nova classificação do TNM que está em vigor é a de 2010 (EDGE et al. 2010) (**Quadro 5**), a qual praticamente não sofreu alterações em relação à de 2002 (GREENE et al. 2002), porém já existe uma atualização da mesma a qual deverá ser implementada a partir de Janeiro de 2018 (BUYOUNOWSKI et al. 2017) (**Quadro 6**).

**Quadro 5 - Classificação TNM do CaP em vigor (2010)**

<b>Estadiamento TNM do CaP</b>		
Tumor primário	T0	Sem evidência tumoral
	T1a	TU incidental < 5% amostra (detectado pela RTU)
	T1b	TU incidental > 5% amostra (detectado pela RTU)
	T1c	TU descoberto em biópsia por agulha por elevação de PSA (com TR normal)
	T2a	TU acomete < ½ de 1 lobo prostático
	T2b	TU acomete > ½ de 1 lobo prostático
	T2c	TU acomete ambos os lobos prostáticos
	T3a	Extensão extracapsular do tumor
	T3b	Tumor invade as vesículas seminais
	T4	TU fixo ou invadindo tecidos adjacentes (pelve, bexiga, intestino e reto)
Linfonodos regionais	N0	Linfonodos não acometidos
	N1	Metástase em linfonodos regionais
Metástase a distância	M0	Ausência de metástase a distância
	M1a	Metástase para linfonodos não regionais
	M1b	Metástase para ossos
	M1c	Metástase para outros órgãos

Legenda: TU – Tumor; RTU – Ressecção transuretral; TR – Toque retal

**Quadro 6** - Classificação TNM do CaP a ser implementada em 2018

<b>Estadiamento CaP (2017)</b>		
Tumor Primário	T2	Órgão confinado
	T3	Extensão extraprostática
	T3a	Extensão extraprostática (uni ou bilateral) ou invasão microscópica da bexiga
	T3b	Invasão da vesícula seminal
	T4	Tumor fixo ou invadindo estruturas adjacentes (esfíncter externo, reto, bexiga e músculos)
Linfonodos regionais	NX	Linfonodos regionais não acessíveis
	N0	Linfonodos negativos
	N1	Metástase em linfonodos regionais
Metástase à distância	M0	Sem metástase à distância
	M1	Metástase à distância
	M1a	Metástase para linfonodos não regionais
	M1b	Metástase óssea
	M1c	Outro sítio de metástase

### 1.2.1.6 Tratamento do CaP

Existem várias formas de condutas de acompanhamento ou de tratamento do paciente com CaP, sendo algumas delas, a vigilância ativa, braquiterapia, prostatectomia radical, prostatectomia parcial, radioterapia e terapia hormonal.

Devido à diferença entre a incidência, mortalidade e a dificuldade de classificação dos tumores quanto a agressividade, muitos pacientes podem ser tratados excessivamente de seus tumores localizados, sem que os mesmos se beneficiem do tratamento definitivo, como por exemplo, a prostatectomia radical (WELCH e BLACK 2010). Como forma de tentar evitar o excesso de tratamento desses tumores considerados indolentes, a vigilância ativa vem sendo empregada. Esta manobra é caracterizada por

retardar um tratamento curativo, e não havendo progressão da doença, evitar tratamentos desnecessários.

Apesar de o raciocínio da vigilância ativa estar bem estabelecido, ainda não há um consenso quanto às características ótimas que os pacientes devem apresentar para serem direcionados a esta conduta. De forma geral, a vigilância ativa pode ser indicada nos casos em que a classificação do tumor seja T1-T2, quando houver ausência do padrão de Gleason 4 e 5 na biópsia (padrão de Gleason  $\leq 3$ ), quando em 12 fragmentos de biópsia menos de 3 sejam positivos e que estes não tenham mais de 50% de tumor e densidade do PSA  $< 0,15 \text{ ng/mL/cm}^3$  (WEIN 2007). Os critérios para inclusão de pacientes na vigilância ativa podem variar entre os centros, e quando esses critérios são comparados, há uma compensação entre sensibilidade e especificidade para a previsão da doença indolente (IREMASHVILI et al. 2012). A maioria dos centros não tem critérios bem estabelecidos quanto a idade do paciente, porém, os pacientes de maior idade podem optar pela vigilância ativa, de forma a monitorar os sinais de progressão da doença, quando uma terapia local secundária ainda pode ser oferecida (DALL'ERA et al. 2008). Os pacientes elegíveis para este tratamento são monitorados a partir da dosagem do PSA total e livre a cada seis meses, juntamente com o exame do TR, uma nova biópsia após um ano e outras biópsias a cada três anos. O tratamento curativo será iniciado nesses casos quando o PSA sofrer uma elevação maior que 0,75 ng/ano, ou, se o tempo de duplicação do PSA for inferior a três anos, ou, se houver alguma alteração no exame de TR, ou quando a

re-biópsia revelar progressão da doença devido a identificação de Gleason > 6 em mais de três fragmentos positivos, ou se for identificado uma porção maior que 50% de tumor ou presença de infiltração perineural (KLOTZ 2005; KLOTZ et al. 2010; TOSOIAN et al. 2011).

Outra opção de tratamento para a doença localizada e de baixo risco é a braquiterapia transperineal, a qual é utilizada desde 1972 no *Memorial Sloan-Kettering Cancer Center* (WHITMORE e WHITMORE 1980). Para ser elegível para este tratamento, os pacientes devem apresentar: estágio T1c-T2c N0, M0; escore de Gleason 6 em mais de uma biópsia randomizada; um PSA inicial  $\leq 10$  ng/mL; menos que 50% dos núcleos envolvidos com câncer e volume prostático menor que 50 mL (ASH et al. 2000). Esta técnica trata-se da implantação de sementes radioativas de iodo 125 (140-160Gy) ou de *palladium* 103 (115-130Gy), guiada por ultrassonografia transretal e planejamento computadorizado. A sobrevida livre de recorrência observada em pacientes submetidos a este tipo de tratamento após 5 anos entre 71% a 93%, e após 10 anos, entre 65% a 85% (HUSARIK et al. 2008).

Os tratamentos cirúrgicos disponíveis para pacientes com CaP consistem na retirada total da glândula prostática, denominada prostatectomia radical (PR), juntamente com a remoção das vesículas seminais e ampolas do ducto deferente e prostatectomia parcial (PP). A PR foi um dos primeiros métodos utilizados para tratamento de CaP, e com ele há a possibilidade de estadiar a doença em questão (YOUNG et al. 1905). Apesar de ser um dos tratamentos mais utilizados, a PR pode levar a



diferentes comorbidades para o paciente, como o desenvolvimento de incontinência urinária (8.7% dos pacientes submetidos a PR) e disfunções sexuais (59.9%) (STANFORD et al. 2000). Já a PP, é indicada para pacientes com tumor de baixo risco e com doença unilateral, porém um dos desafios para a escolha deste tratamento está em mapear e localizar de forma mais precisa o tumor presente no órgão (TAREEN et al. 2009).

A privação adjuvante do andrógeno após a PR é um pouco controversa, estudos mostram que em pacientes com linfonodos acometidos, este tipo de estratégia mostra um aumento significativo na sobrevida dos pacientes em relação àqueles que não passaram por este tratamento adjuvante (MESSING et al. 2006), porém outro mostra que não há diferença estatística entre receber ou não o tratamento adjuvante (WONG et al. 2009). A privação neoadjuvante androgênica não mostrou vantagem com relação à sobrevida global e sobrevida livre de progressão, não tendo assim, um papel significativo no tratamento cirúrgico do CaP (SHELLEY et al. 2009).

Com relação à radioterapia, temos a administração de doses de radiação gama em frações de 180 a 200 cGy, dirigidas para a próstata e tecidos adjacentes. A radioterapia pode ser realizada de forma convencional, a qual é feita através de campos, o ântero-posterior e o látero-lateral (KESTIN et al. 2002), ou através da técnica conformacional 3D (C-3D), a qual minimiza os danos teciduais causados pela radiação na região da bexiga e do reto e melhor distribui a dose radioterápica na próstata (FRAASS et al. 1995; KESTIN et al. 2002).

### 1.2.1.7 Aspectos genéticos e moleculares do CaP

A definição de perfis genéticos e moleculares são extremamente promissores para auxiliar na subclassificação dos tumores e guiar o médico para uma seleção mais precisa em relação a qual intervenção terapêutica utilizar (ABESHOUSE et al. 2015). Em relação ao CaP, vários aspectos no âmbito molecular vêm sendo explorados com objetivo de identificar biomarcadores para melhor estratificar e distinguir os casos de CaP indolentes dos agressivos. Estudos mais recentes que exploraram aspectos moleculares de tumores primários de próstata identificaram alterações genômicas recorrentes incluindo, metilação do DNA, mutações, alteração no número de cópias, rearranjos e fusões gênicas.

Um desses aspectos importantes e que vem sendo explorado é a metilação do DNA, onde uma análise geral, mostra que aproximadamente 26% dos tumores podem estar sendo acometidos por eventos desconhecidos, dentre estes, a metilação do DNA.

A hipermetilação das regiões promotoras de genes supressores tumorais, é um mecanismo importante de inativação gênica, o qual pode levar a alterações de vias essenciais no processo de transformação e progressão tumoral (SHARMA et al. 2009). A hipermetilação do promotor do gene *GSTP1* foi uma das primeiras alterações epigenéticas demonstrada em CaP, e é a mais frequente neste tipo de tumor, presente em aproximadamente 90% dos casos (LEE et al. 1994; SINGAL et al. 2004). Estudos mostraram que hipermetilação nas ilhas CpG de regiões promotoras dos genes *GSTP1*, *APC*, *RASSF1a*, *PTGS2* e *MDR1*, podem

distinguir tumores primários de próstata de condições benignas do tecido prostático, com sensibilidade de 97-100% e especificidade de 92-100% (YEGNASUBRAMANIAN et al. 2004; JERÓNIMO et al. 2004; KANG et al. 2004; BIANCO-MIOTTO et al. 2010). Além disso, a hipermetilação do gene *EDNRB* foi correlacionada com a discriminação do grau e estadio de tumores primários de próstata, bem como a hipermetilação do gene *PTGS2* com o aumento do risco de recorrência da doença (YEGNASUBRAMANIAN et al. 2004). Apesar de a hipermetilação ser uma frente interessante com grande potencial como biomarcador na distinção de tumores agressivos, mais estudos precisam ser realizados para que esta metodologia seja empregada na rotina (FEBBO et al. 2009).

As alterações mais comumente encontrada em CaP são as fusões gênicas relacionadas com promotores regulados por andrógenos com, principalmente, o gene *ERG* e outros fatores de transcrição (*ETS*), sendo a fusão *TMPRSS2-ERG* mais a frequente em CaP (TOMLINS et al. 2005), a qual é identificada em 40-50% dos tumores de próstata em mais de 100.000 casos anuais nos Estados Unidos (TOMLINS et al. 2009; BERGER et al. 2011). Contudo, apesar desta fusão gênica ser um evento câncer específico (LEYTEN et al. 2015), o valor prognóstico da mesma ainda é controverso (FLEISCHMANN et al. 2014; HAGEN et al. 2014; MOUNIR et al. 2015).

Outro tipo de alteração frequentemente encontrada em CaP são os desbalanços no número de cópias do DNA, onde em tumores primários mais agressivos e em casos metastáticos é observado um maior número de

alterações quando comparado com tumores indolentes, acarretando em maior número de casos com recidiva da doença (TAYLOR et al. 2010; HIERONYMUS et al. 2014; LALONDE et al. 2014).

Diferentemente de outros tipos tumorais, alterações somáticas pontuais são menos comuns em tumores de próstata. Um estudo realizado por KAN et al. (2010), analisou 441 amostras de tumores primários, dentre estes, tumores de mama, pulmão, ovário, pâncreas e próstata, e identificou que adenocarcinoma e carcinoma escamoso de pulmão tiveram as maiores taxas de mutação, com 3,5 e 3,9 mutações por Mb (megabase) respectivamente, em contraste, os tumores de próstata tiveram a menor taxa de mutação, com 0,33 mutações por Mb. No mais, muitos estudos estão sendo realizados com objetivo de identificar e catalogar as alterações pontuais recorrentes para um melhor entendimento da biologia desse tipo tumoral e identificar vias associadas com a progressão do tumor (ABESHOUSE et al. 2015). Alguns genes têm sido descritos por estarem frequentemente alterados por decorrência de mutações somáticas, entre eles o *SPOP*, mutado em 15% dos tumores de próstata avaliados (BARBIERI et al. 2012), bem como mutações em genes que participam da via do receptor de andrógeno, como *FOXA1*, *UTX*, *MLL2* e *ASXL1* (GRASSO et al. 2012), e também os que participam de outras vias, como *TP53*, *PTEN*, *CDKN1*, *DLX1*, *CHD1* e *MED12* (YADAV et al. 2015; ROBINSON et al. 2015).

Portanto, partindo dessas informações, as quais em sua maioria foram adquiridas através do sequenciamento do genoma completo ou

exoma de tumores de próstata, alguns projetos vêm sendo elaborados com intuito de desenvolver painéis que permitem avaliar de forma mais pontual e menos custosa um espectro de mutações tumores-específicas, direcionando o paciente para a melhor abordagem terapêutica. A exemplo disso, podemos citar o trabalho de MANSION-BAHR et al. (2015), o qual constatou a possibilidade de realizar o rastreamento de mutações pontuais, bem como de rearranjos genômicos em um painel de 365 genes (implicados com desenvolvimento do câncer presentes no *Sanger CGP Cancer Genes V3 panel*), utilizando como metodologia o sequenciamento de nova geração de DNA obtido de amostras de biópsia de próstata. Neste estudo, os autores identificaram mutações recorrentes em genes relacionados com regulação da transcrição e remodelamento de cromatina (*SPOP*, *ASXL1*, *KDM5C* e *NCOR2*), codificadores de proteínas que participam da estrutura da forquilha do DNA (*FOXA1*), genes que realizam interações com histonas (*UTX* e *SETD2*), que participam de vias de sinalização envolvendo receptores de membrana (*PIK3CB*) e crescimento/proliferação celular (*MAP2K5*). As mutações somáticas encontradas neste conjunto de genes, podem favorecer a identificação de fortes candidatos à biomarcadores de prognóstico, bem como novos alvos terapêuticos (MANSION-BAHR et al. 2015).

Frente à esse complexo cenário de alterações genômicas presentes no CaP, pesquisadores do projeto TCGA (do inglês, *The Cancer Genome Atlas*) tiveram a iniciativa de analisar 333 tumores de próstata nos aspectos clínicos, patológicos e moleculares, utilizando 7 plataformas genômicas.

Com essas análises foi possível identificar novas alterações, bem como alterações já previamente conhecidas. Entre os achados deste estudo, foi visto que 74% dos tumores selecionados apresentaram pelo menos uma fusão gênica envolvendo os genes *ERG* (46%), *ETV1* (8%), *ETV4* (4%) ou *FLI1* (1%). Apesar da fusão *TMPRSS2-ETS* ser a mais frequente, outros genes também foram encontrados fusionados com genes da família dos fatores de transcrição *ETVS*, como por exemplo, os genes *SLC45A3* e *NDRG1*. Alguns componentes da família dos *ETS* foram encontrados super expressos, decorrentes de mecanismos epigenéticos ou de translocações crípticas com o surgimento de rearranjos entre *ETV1* com uma região cromossômica perto do gene *MIPOL1*, como similarmente identificado em trabalhos anteriores (TOMLINS et al. 2009; GASI et al. 2011). Com relação às mutações, 11% dos casos apresentaram mutações no gene *SPOP*, 3% no *FOXA1* e 1% no gene *IDH* – já reportados anteriormente, em frequências similares.

Além disso, foi encontrada uma relação de mutualidade entre a presença de mutação no gene *SPOP* com o gene *FOXA1*, indicando que ambas as mutações são clonais provenientes da mesma célula tumoral. Outras alterações em CaP são também encontradas de forma simultânea, como deleções no gene *PTEN* em casos positivos de fusões gênicas com *ERG* (TAYLOR et al. 2010), e mutações em *SPOP* juntamente com rearranjos com representantes da família *ETS* (BARBIERI et al. 2012). Novas relações também foram encontradas, como por exemplo, mutações simultâneas em *SPOP* com deleção do gene *CHD1*, levando a

caracterização de um padrão nos tumores incluindo elevados níveis de metilação do DNA, padrões de expressão específico como super expressão de *SPINK1*. Além disso, também identificaram um novo subtipo distinto de CaP definido por uma mutação *hotspot* no gene *IDH1* (ABESHOUSE et al. 2015).

Apesar de diversos estudos terem sido realizados, com a finalidade de rastrear as alterações frequentes em CaP 26% dos tumores estudados molecularmente, pareciam estar sendo conduzidos por eventos moleculares ainda desconhecidos ou por uma ou mais alterações. Uma análise de enriquecimento realizada por este mesmo grupo, mostrou que este subset de tumores estava enriquecido por mutações nos genes *TP53*, *KDM6A* e *KMT2D*, além de deleções nos cromossomos 6 e 16 e amplificações nos cromossomos 8 e 11. Apesar de vários trabalhos já existentes com tumores de próstata, poucos separam os tumores quanto aos diferentes graus de Gleason. Por tratar-se de uma doença de comportamento indolente, tumores com diferentes graus de Gleason apresentam comportamentos clinicamente distintos, sendo assim, estudos de tumores com o mesmo grau de Gleason e diferentes desfechos clínicos tornam-se promissores na identificação de marcadores de recidiva bioquímica, por exemplo.

Mais recentemente, FRASER et al. (2017) desenvolveu um estudo, com aspectos similares ao nosso, com o objetivo de identificar marcadores genômicos em tumores de próstata localizados e não indolentes. Para isto, realizaram o sequenciamento do genoma completo de 130 amostras de

tumores de próstata com escore de Gleason 3+3, 3+4 e 4+3, e analisaram o perfil quanto às alterações no número de cópias de 284 tumores localizados.

Os perfis analisados mostraram alterações já previamente relatadas, como ganhos em *MYC* e deleções em *PTEN*, *TP53* e *NKX3-1*. Além disso, observaram uma baixa taxa de SNV, com uma média de 0,53 SNV somáticas por milhões de pares de base entre todos os tumores. Quando comparados os números de alterações por grau de Gleason, foi identificado um número significativamente maior de SNVs e rearranjos em tumores contendo o padrão de Gleason 4. Apenas seis genes apresentaram mutações em regiões codificantes em mais de 2% dos tumores, *SPOP* (8%), *TTN* (4,4%), *TP53* (3,4%), *MUC16* (2,5%), *MED12* (2,3%) e *FOXA1* (2,3%). O gene *AR* apresentou mutações não sinônimas em apenas 2 tumores, deleções em 4 e amplificação em 1.

Apesar de buscarem identificar alterações preditoras de recorrência, em todos os casos avaliados, encontraram apenas uma SNV no gene *ATM* presente apenas em casos que sofreram recidiva da doença (8 casos com mutação de *ATM* dentre os casos com recidiva da doença). Portanto, apesar de terem uma casuística grande, observaram uma grande heterogeneidade inter-tumoral e poucas alterações foram encontradas como associadas com características clínicas como grau de Gleason e recidiva bioquímica.



## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Identificar um perfil de mutações somáticas em adenocarcinoma de próstata em espécimes classificadas com escore de Gleason 7 e 8, com e sem recidiva bioquímica.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Selecionar um painel de genes com mutações frequentes em adenocarcinoma de próstata a partir de dados da literatura e de painéis já comercializados;
- Rastrear mutações somáticas por sequenciamento de nova geração utilizando um painel de genes customizado, em amostras de adenocarcinoma de próstata classificados com escore de Gleason 7 e 8;
- Identificar genes e/ou vias gênicas alteradas nos tumores com e sem recidiva bioquímica;
- Identificar possíveis associações das mutações somáticas encontradas com características clínico patológicas.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 CASUÍSTICA

Os casos selecionados para este trabalho foram pacientes diagnosticados com adenocarcinoma de próstata classificados com escore de Gleason 7 ou 8 na peça cirúrgica, submetidos a prostatectomia radical no Departamento de Tumores Urológicos do A.C.Camargo Cancer Center, que apresentaram ou não recidiva bioquímica.

A seleção dos pacientes foi realizada a partir da análise dos dados clínicos e anatomopatológicos presentes nos prontuários dos mesmos e disponíveis no sistema intranet interno do hospital (H2TC), disponibilizado pela instituição, sob a supervisão do Dr. Gustavo Guimarães, urologista e chefe do Núcleo de Urologia da instituição. As informações coletadas de cada paciente, quando disponíveis, foram: idade do paciente, dosagens de PSA sérico pré cirúrgico, data de realização da cirurgia de prostatectomia radical (PR), acompanhamento de todas as dosagens de PSA sérico após a cirurgia, grau de Gleason primário e secundário, escore de Gleason, tipo histológico do tumor, estadiamento clínico pelo sistema TNM, estadiamento pós cirúrgico, volume da neoplasia, invasão angiolinfática, *status* das margens cirúrgicas (livres ou acometidas), *status* dos linfonodos dissecados, ocorrência de recidiva e sua data de detecção.

Como critérios de inclusão, o paciente deveria apresentar: margens cirúrgicas livres de neoplasia, ausência de acometimento linfonodal no momento da cirurgia e queda do PSA sérico pós cirúrgicos. A recidiva bioquímica foi considerada pela detecção de PSA sérico  $\geq 0,2$  ng/mL após a cirurgia, enquanto os pacientes sem recidiva bioquímica apresentaram PSA sérico  $< 0,2$  ng/mL em todas as avaliações pós-cirúrgicas.

### 3.2 EXTRAÇÃO DO DNA

Previamente à extração do DNA, uma nova lâmina do tecido foi obtida e corada com hematoxilina e eosina (H&E) para que os casos fossem novamente avaliados por uma patologista especialista, Dr<sup>a</sup> Isabela Werneck, para garantir que todos os casos selecionados tratavam-se de adenocarcinoma acinar usual de próstata e para anotação do valor do escore de Gleason da porção do tumor da qual seria extraído o DNA, além disso, confirmar a presença do valor mínimo de 70% de células tumorais.

Para os casos selecionados e revisados, o DNAg dos tecidos congelados (tumor ou tecido normal adjacente ao tumor) e de leucócito foi extraído pelo Banco de Macromoléculas do A.C.Camargo Cancer Center, seguindo protocolos otimizados. As amostras foram quantificadas no *Qubit® Fluorometer* e a pureza e integridades das mesmas foram analisadas pelo *Nanodrop™ 2000* e em gel de agarose, respectivamente.

Os Quadros 7, 8 e 9 trazem as anotações das avaliações das lâminas de H&E, protocolos de extração de DNAg, razão 260/280 e razão 260/230,

integridade e quantificação das amostras de DNA tumoral, DNA de leucócito e DNA de borda tumoral, respectivamente.

**Quadro 7 - Avaliação as amostras tumorais utilizadas no estudo**

ID Amostra	Avaliação do H&E (Patologista)	Protocolo de Extração	R 260/280	R 260/230	Integridade	QUBIT (ng/uL)
T01	3 (90%) + 4 (10%)	Fenol /Clorofórmio	1,9	2,2	Excelente (Banda única)	217,2
T02	3+3 (100%)	Fenol /Clorofórmio	1,9	2,3	Excelente (Banda única)	51,8
T03	3+3 (100%)	Fenol /Clorofórmio	2,0	1,9	Excelente (Banda única)	77,5
T04	4+4 (100%)	Fenol /Clorofórmio	1,9	2,0	Bom (Smear)	400
T05	3 (90%) + 4 (10%)	Fenol /Clorofórmio	1,9	2,2	Ótimo (Smear com banda)	611
T06	3 (70%) + 4 (30%)	Fenol /Clorofórmio	2,0	2,0	Excelente (Banda única)	117,9
T07	3 (90%) + 4 (10%)	Fenol /Clorofórmio	2,1	2,1	Ótimo (Smear com banda)	337
T09	3 (90%) + 4 (10%)	Fenol /Clorofórmio	2,0	2,3	Ótimo (Smear com banda)	64,4
T10	4 (60%) + 3 (40%)	Fenol /Clorofórmio	2,0	2,3	Excelente (Banda única)	975
T12	4 (60%) + 3 (40%)	Fenol /Clorofórmio	1,9	2,3	Excelente (Banda única)	110
T13	3+3 (100%)	Fenol /Clorofórmio	2,2	2,4	Excelente (Banda única)	27,8
T14	3 (60%) + 4 (40%)	Fenol /Clorofórmio	2,0	2,2	Ótimo (Smear com banda)	120
T15	4 (60%) + 3 (40%)	Fenol /Clorofórmio	2,0	2,2	Ótimo (Smear com banda)	120
T16	4+4 (100%)	Fenol /Clorofórmio	2,3	2,4	Excelente (Banda única)	293
T17	3+3 (100%)	Fenol /Clorofórmio	2,1	2,4	Ótimo (Smear com banda)	87,6
T18	4 (60%) + 3 (40%)	Fenol /Clorofórmio	1,9	2,0	Excelente (Banda única)	110
T19	3 (70%) + 4 (30%)	Fenol /Clorofórmio	2,0	2,2	Ótimo (Smear com banda)	236
T20	3 (70%) + 4 (30%)	Fenol /Clorofórmio	2,1	2,0	Bom (Smear)	110
T21	4+4 (100%)	Fenol /Clorofórmio	2,0	2,2	Excelente (Banda única)	100
T22	4 (60%) + 3 (40%)	Fenol /Clorofórmio	2,1	2,1	Excelente (Banda única)	120
T23	3 (70%) + 4 (30%)	Fenol /Clorofórmio	1,9	2,2	Bom (Smear)	96,2
T24	4+4 (100%)	Fenol /Clorofórmio	2,0	2,3	Ótimo (Smear com banda)	88,2
T25	3 (90%) + 4 (10%)	Fenol /Clorofórmio	2,0	2,2	Ótimo (Smear com banda)	143,5
T26	4 (80%) + 3 (30%)	Fenol /Clorofórmio	1,9	2,4	Excelente (Banda única)	65,8
T27	3 (90%) + 4 (10%)	Fenol /Clorofórmio	2,0	2,2	Excelente (Banda única)	110
T28	4+4 (100%)	Fenol /Clorofórmio	2,8	2,9	Excelente (Banda única)	38,1
T29	3 (90%) + 4 (10%)	Fenol /Clorofórmio	2,0	2,1	Ótimo (Smear com banda)	449,5

**Cont/ Quadro 7**

<b>ID Amostra</b>	<b>Avaliação do H&amp;E (Patologista)</b>	<b>Protocolo de Extração</b>	<b>R 260/280</b>	<b>R 260/230</b>	<b>Integridade</b>	<b>QUBIT (ng/uL)</b>
T30	4 (90%) + 3 (10%)	Fenol /Clorofórmio	2,0	2,2	Excelente (Banda única)	31,7
T31	4+4 (100%)	Fenol /Clorofórmio	2,0	2,1	Excelente (Banda única)	90,3
T32	4+4 (100%)	Fenol /Clorofórmio	2,0	2,1	Excelente (Banda única)	80,6
T33	3+3 (100%)	Fenol /Clorofórmio	1,9	2,1	Excelente (Banda única)	96
T34	4 (60%) + 3 (40%)	Fenol /Clorofórmio	2,1	2,3	Excelente (Banda única)	63,4
T35	4+4 (100%)	Fenol /Clorofórmio	1,9	2,2	Excelente (Banda única)	100
T36	-	-	-	-	-	36,92
T37	-	-	-	-	-	80,4
T38	3 (90%) + 4 (10%)	QIAamp DNA Micro kit (LCM Tissues)	-	-	-	18,95
T39	4 (60%) + 3 (40%)	QIAamp DNA Micro kit (LCM Tissues)	-	-	-	19,3
T40	3 (70%) + 4 (30%)	QIAamp DNA Micro kit (LCM Tissues)	-	-	-	25,6
T41	-	-	-	-	-	760
T42	-	-	-	-	-	991
T43	-	-	-	-	-	128

**Quadro 8 - Avaliação das amostras de leucócitos utilizadas no estudo.**

ID Amostra	Protocolo de Extração	R 260/280	R 260/230	Integridade	Concetração QUBIT (ng/uL)
SG09	QIASymphony DNA Mini Kit – BC200-V7	1,88	2,27	Excelente (Banda única)	330
SG26	QIASymphony DNA Mini Kit – BC200-V7	1,85	2,36	Excelente (Banda única)	85,2
SG29	QIASymphony DNA Mini Kit – BC200-V7	1,91	2,25	Excelente (Banda única)	100
SG13	QIASymphony DNA Mini Kit – BC200-V7	1,89	1,05	Excelente (Banda única)	25,1
SG12	QIASymphony DNA Mini Kit – BC200-V7	1,88	2,59	Excelente (Banda única)	25,9
SG01	QIASymphony DNA Mini Kit – BC200-V7	1,85	2,53	Excelente (Banda única)	72,5
SG02	QIASymphony DNA Mini Kit – BC200-V7	1,87	2,56	Excelente (Banda única)	29,5
SG03	QIASymphony DNA Mini Kit – BC200-V7	1,85	2,92	Excelente (Banda única)	252,9
SG25	QIASymphony DNA Mini Kit – BC200-V7	1,91	2,4	Excelente (Banda única)	91,1
SG24	QIASymphony DNA Mini Kit – BC200-V7	1,9	2,52	Excelente (Banda única)	55,2
SG23	QIASymphony DNA Mini Kit – BC200-V7	1,92	1,27	Excelente (Banda única)	43,6
SG06	QIASymphony DNA Mini Kit – BC200-V7	1,91	2,33	Excelente (Banda única)	111,6
SG22	QIASymphony DNA Mini Kit – BC200-V7	1,88	2,4	Excelente (Banda única)	40,1
SG21	QIASymphony DNA Mini Kit – BC200-V7	1,82	2,22	Excelente (Banda única)	26,5
SG20	QIASymphony DNA Mini Kit – BC200-V7	1,94	1,35	Excelente (Banda única)	25,5
SG19	QIASymphony DNA Mini Kit – BC200-V7	1,86	2,39	Excelente (Banda única)	29,2
SG18	QIASymphony DNA Mini Kit – BC200-V7	1,87	1,75	Excelente (Banda única)	62,5
SG05	QIASymphony DNA Mini Kit – BC200-V7	1,91	2,58	Excelente (Banda única)	72,8
SG17	QIASymphony DNA Mini Kit – BC200-V7	1,85	1,93	Excelente (Banda única)	66,8
SG16	QIASymphony DNA Mini Kit – BC200-V7	1,92	1,35	Excelente (Banda única)	25,9
SG28	QIASymphony DNA Mini Kit – BC200-V7	1,88	2,39	Excelente (Banda única)	110
SG04	QIASymphony DNA Mini Kit – BC200-V7	1,89	2,78	Excelente (Banda única)	33,1
SG15	QIASymphony DNA Mini Kit – BC200-V7	1,81	2,03	Excelente (Banda única)	71,7
SG14	QIASymphony DNA Mini Kit – BC200-V7	1,91	1,39	Excelente (Banda única)	21,7
SG07	QIASymphony DNA Mini Kit – BC200-V7	1,51	1,07	Excelente (Banda única)	16,3
SG34	QIASymphony DNA Mini Kit – BC200-V7	1,9	3,53	Excelente (Banda única)	11,9
SG27	QIASymphony DNA Mini Kit – BC200-V7	1,87	2,35	Excelente (Banda única)	73,1

**Quadro 9** - Avaliação das amostras de borda adjacente ao tumor.

ID Amostra	Avaliação do H&E	Protocolo de Extração	R 260/280	R 260/230	Integridade	Concetração QUBIT (ng/uL)
B30	Não neoplásico em 100% da amostra.	Fenol /Clorofórmio	1,8	1,6	Ótimo (Smear com banda)	484
B10	Não neoplásico em 100% da amostra.	Fenol /Clorofórmio	1,9	2,3	Excelente (Banda única)	861
B33	Não neoplásico em 100% da amostra.	Fenol /Clorofórmio	2,0	2,3	Ótimo (Smear com banda)	207,3
B31	Não neoplásico em 100% da amostra.	Fenol /Clorofórmio	2,1	2,3	Excelente (Banda única)	75,2
B35	Não neoplásico em 100% da amostra.	Trizol	2,0	1,9	Bom (Smear)	129
B35	Não neoplásico em 100% da amostra.	Fenol /Clorofórmio	2,0	2,2	Excelente (Banda única)	369



### 3.3 SEQUENCIAMENTO

#### 3.3.1 Construção do painel

Com o objetivo de tornar o trabalho mais específico, um painel customizado de genes foi desenvolvido com auxílio da ferramenta *online DesignStudio (Illumina)*, baseado em genes disponíveis em painéis já comercializados de genes mutados em tumores sólidos e na inserção de novos genes presentes na literatura e descritos por estarem frequentemente mutados em CaP ou por participarem de vias de sinalizações importantes para a progressão tumoral (**Quadro 10**). O projeto de desenho das sondas foi baseado na inserção das coordenadas de regiões dos genes de interesse no *DesignStudio*, o qual possui um algoritmo próprio que considera uma série de fatores para desenhar as sondas, como: conteúdo GC, especificidade, interação e cobertura das sondas. Esses fatores são parâmetros importantes utilizados para otimizar o desenho das regiões de interesse.

Após a submissão das coordenadas das regiões de interesse dos 58 genes no *DesignStudio*, totalizando 706 regiões de alvos inseridos, fizemos a otimização das regiões de interesse juntamente com o suporte técnico da empresa *Illumina* e uma inspeção manual de todos os amplicons, com auxílio da ferramenta *Genome Browser* disponibilizada pela UCSC (Universidade Da Califórnia Santa Cruz), de forma a garantir a melhor cobertura possível das regiões codificantes dos genes alvos.

O painel customizado foi baseado na tecnologia *TruSeq Custom Amplicon (Illumina)*, contendo iniciadores para amplificar 1502 amplicons com tamanho de 250 pares de base, totalizando 213.081 bases, após otimização da ferramenta.

**Quadro 10** - Lista de genes selecionados para compor o painel customizado.

Genes selecionados e inseridos no painel customizado			
Genes frequentemente alterados em tumores sólidos		Genes frequentemente alterados em CaP	
		Genes	Referências
AKT1		AR	Grasso et al, 2012
ATM		ASXL1	Grasso et al, 2012
BRAF		KDM6A	Grasso et al, 2012
CDKN2A		MLL2	Grasso et al, 2012
CTNNB1		CDKN1B	Chang et al, 2004
EGFR		CHD1	Yadav et al, 2015
ERBB2		FOXA1	Barbieri et al, 2012
EZH2		MED12	Barbieri et al, 2012
FBXW7		SPOP	Barbieri et al, 2012
FGFR2		KDM5C	Stein et al, 2014
FGFR3		MAP2K5	Manson et al, 2014
GNAQ		NCOR2	Manson et al, 2014
GNAS		RB1	Gordon et al, 2015
HNF1A		STK3	Huang et al, 2015
HRAS		TNFSF10	Huang et al, 2015
IDH1		MTOR	Robbins et al, 2011
IDH2		CHD5	Robbins et al, 2011
JAK2		DLK2	Kumar et al, 2011
KDR		GPC6	Kumar et al, 2011
KIT		SDF4	Kumar et al, 2011
KRAS		PLXNB1	Wong et al, 2007
MAP2K1		SPINK1	Tomlins et al, 2011
MET		BRCA1	Cavanagh et al, 2015
MLH1		BRCA2	Narod et al, 2008
MSH2		-	-
MSH6		-	-
NCOA2		-	-
NRAS		-	-
PDGFRA		-	-
PIK3CA		-	-
PTEN		-	-
RET		-	-
TP53		-	-
VHL		-	-

### 3.3.2 Construção das bibliotecas

O protocolo empregado para a construção das bibliotecas foi o *TruSeq Custom Amplicon Library Preparation* (TSCA – Catálogo FC-130-9005DOC; Rev.C), o qual permite o sequenciamento de regiões direcionadas do genoma, com até 1536 *amplicons* em uma única reação de *multiplex*, com índices integrados para sequenciar até 96 amostras de uma vez.

#### 3.3.2.1 Qualidade e quantificação do DNA inicial

Partindo do protocolo do kit *TruSeq Custom Amplicon*, o DNA inicial utilizado para a construção das bibliotecas foi o DNA genômico (DNAg) extraído de tecido congelado e leucócito.

As principais recomendações dadas pelo fabricante em relação ao DNAg inicial, para que a construção e rendimento da biblioteca seja satisfatória, é que a massa inicial seja de 250 nanogramas (ng) em um volume de no máximo 15 microlitros (uL) e a razão de pureza A260/A280 seja 1,8-2,0.

A quantificação do DNAg inicial foi feita utilizando o *Qubit® Fluorometer* com o *kit Qubit® dsDNA HS Assay* (Thermo Fisher, EUA), o qual trata-se de um método de quantificação baseado em fluorescência que emprega fluorófilos específicos que se ligam ao DNA dupla fita, levando a uma quantificação mais específica e exata quando comparada com métodos baseados em espectrometria. Após a quantificação do DNAg inicial, diluímos

as amostras para ficarem em uma concentração inicial de 25 ng/uL e as colocamos em uma placa de 96 poços.

### **3.3.2.2 Hibridização dos oligonucleotídeos**

Adicionamos ao DNAg inicial o conjunto de oligonucleotídeos customizados juntamente com os oligonucleotídeos de sequenciamento. Para que ocorresse a hibridização dos oligonucleotídeos na região de interesse do DNAg, incubamos a placa por 1 minuto a 95°C em um termobloco, e após isso, ajustamos a temperatura do mesmo para 40°C, deixando a placa durante 80 minutos neste processo de esfriamento gradual, o qual é o ponto mais crítico desta etapa.

### **3.3.2.3 Remoção dos oligonucleotídeos não ligados**

Para a remoção dos óligos não ligados ao DNA, uma placa-filtro com capacidade de selecionar moléculas de DNA por tamanho e alguns tampões específicos, foram utilizados para remover os óligos em excesso na reação. O DNA de interesse, permanece no filtro da placa, e a reação seguinte ocorreu no próprio filtro.

### **3.3.2.4 Extensão e ligação dos oligonucleotídeos ligados**

Nesta etapa, incubamos por 45 minutos a 37°C o DNAg hibridizado com um *mix* de extensão e ligação, o qual possui uma DNA polimerase que faz a extensão da região alvo a partir do oligo à extremidade 3' da região (*upstream*), seguido por uma ligação à extremidade 5' do oligo (*downstream*)

com auxílio de uma DNA ligase. Ao final desta etapa, formamos os produtos contendo as regiões de interesse flanqueadas por sequências requeridas para a amplificação. Para remover da placa-filtro os produtos de interesse, utilizamos 25 uL de uma solução de NaOH a 50 milimolar (mM) e incubamos por 5 minutos em temperatura ambiente. Após este período, ressuspendemos a solução no poço com o filtro, e transferimos 20 uL do produto para uma nova placa de PCR.

### 3.3.2.5 Amplificação por PCR das regiões de interesse

As regiões de interesse passaram por um processo de amplificação por PCR.

Para a reação de PCR, utilizamos o *master mix* e um conjunto de primers disponibilizados pelo fabricante, contendo sequências índices (i5 e i7) para multiplexação das amostras, bem como adaptadores (P5 e P7), requeridos para a formação de agrupamentos de sequências (*clusters*) para a etapa de sequenciamento. A reação foi submetida a 23 ciclos com o seguinte programa de temperaturas:

**Quadro 11** - Programa de ciclos e temperaturas para amplificação das regiões de interesse por PCR

N° de ciclos	Temperatura	Tempo
1	95°C	3 min
23	95°C	30 seg
	66°C	30 seg
	72 °C	60 seg
1	72°C	5 min
Manter a 10°C		

### 3.3.2.6 Purificação dos produtos de PCR

Para garantir que sejam sequenciadas apenas as regiões de interesse que foram amplificadas (*amplicons* com 250 pares de base), purificamos os produtos de PCR com a utilização de 45 uL (1 DNA:1,8 beads) das esferas magnéticas *Agencourt® AMPure® XP beads*, afim de retirar outros componentes da reação, como por exemplo, dímeros de primers e adaptadores não ligados.

Após a purificação, para confirmar o sucesso da amplificação e purificação das bibliotecas, fizemos uma análise de distribuição dos fragmentos com o *Bioanalyzer 2100 (Agilent® High Sensitivity Kit- Califórnia, EUA)* para garantir que os tamanhos das bibliotecas estivessem como esperado, aproximadamente 350 pares de base (250 pares de base do amplicon mais aproximadamente 100 pares de base de índices e adaptadores), e sem dímeros de primers ou restante de adaptadores.

### 3.3.3 Quantificação das bibliotecas por qPCR

Para a quantificação das bibliotecas a serem sequenciadas na plataforma *Illumina NextSeq 500*, utilizamos o kit de quantificação *KAPA SYBR FAST qPCR*, o qual foi desenvolvido para quantificar bibliotecas flanqueadas pelos adaptadores P5 e P7.

A quantificação foi realizada baseada em uma curva padrão com 6 concentrações de DNA pré diluídos, usando *KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix* e primers que têm como alvo as sequências dos oligos P5 e P7.

As concentrações das bibliotecas foram calculadas de acordo com a concentração da curva padrão, utilizando a quantificação absoluta.

As reações foram feitas utilizando 4 uL das bibliotecas diluídas, para que estas ficassem dentro da curva padrão, com 6 uL do *KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix*. A ciclagem recomendada e utilizada foi:

**Quadro 12** - Programa utilizado na reação de qPCR (*KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix*) para quantificação das bibliotecas

Passo	Temperatura	Duração	Ciclos
Denaturação inicial	95°C	5 min	1
Denaturação	95°C	30 seg	35
Anelamento/Extensão/Aquisição de dados	60°C	45 seg	
Curva de dissociação	65°C – 95°C		

Com os tamanhos dos fragmentos das bibliotecas, obtidos com o *Bioanalyzer*, e a quantificação por qPCR, foram calculadas quantidades equimolares de cada biblioteca, como forma de normalizá-las para ficarem em uma concentração inicial de 4nM para iniciarmos as diluições necessárias para o sequenciamento.

### 3.3.4 Sequenciamento na plataforma *NextSeq - Illumina*

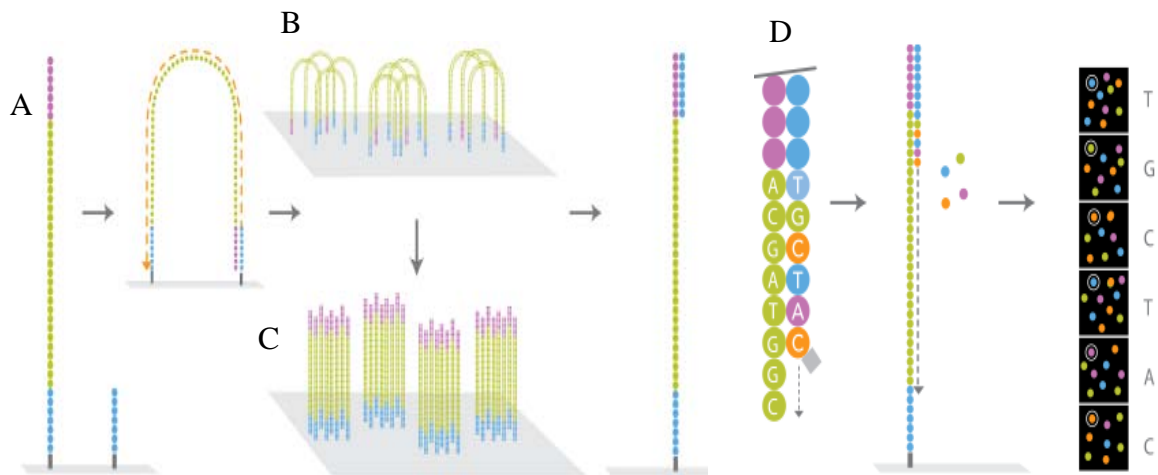
O sequenciamento do painel customizado foi realizado na plataforma *NextSeq 500, Illumina*, onde nesta, as moléculas de DNA das regiões de interesse são hibridizadas a oligonucleotídeos que estão ligados à *flowcell*. Neste momento, uma polimerase faz a extensão de uma fita complementar

ao fragmento, formando uma dupla fita. Esta dupla fita é desnaturada, e a fita original é lavada. A fita que permaneceu se curva, formando uma ponte hibridizando sua extremidade em outro óligo complementar presente na *flowcell*. A polimerase liberada na reação realiza a extensão de uma fita complementar, formando uma ponte com dupla fita. Esta ponte passa por processo de desnaturação, formando então duas cópias do fragmento. Essas cópias se curvam, formando novas pontes, as quais passam pelo processo de amplificação inúmeras vezes. Após isto, as fitas reversas são lavadas, permanecendo na *flowcell* apenas as *forward*s. Para iniciar a leitura dos fragmentos *forward*s, ocorre a introdução do 1º primer de sequenciamento, iniciando assim a leitura do fragmento R1, onde a cada ciclo ocorre a incorporação de uma base e a emissão da fluorescência correspondente. Após isso, o produto da fita *forward* é lavado. Novamente ocorre a formação das pontes, amplificação dos fragmentos, porém desta vez, o fragmento original é lavado deixando apenas as fitas reversas. Para a leitura desta outra fita, R2, ocorre a introdução de um 2º primer de sequenciamento para que ocorra a síntese e a leitura dos fragmentos R2. A **Figura 5** explica de forma ilustrativa esta etapa de amplificação por PCR em ponte, a qual permite a formação de conjuntos de regiões iguais, “*clusters*”, na mesma região da *flowcell*. A leitura dos fragmentos é realizada base a base, onde em cada incorporação de um nucleotídeo ocorre um bloqueio de sinal, fazendo com que o equipamento leia um nucleotídeo por vez.

O equipamento é capaz de realizar a leitura dos nucleotídeos incorporados em duas cores, ou seja, a incorporação de timinas (T) emite



uma fluorescência de cor verde, as citosinas (C) cor vermelha, adeninas (A) cor amarela, a qual é a mistura das cores verde e vermelha, e a guanina (G) é identificada pela ausência de fluorescência (BRONNER et al. 2009).



**Fonte:** [https://www.dkfz.de/gpcf/hiseq\\_technology.html](https://www.dkfz.de/gpcf/hiseq_technology.html)

**Figura 5** – Metodologia do sequenciamento na plataforma *Illumina*. Em A podemos ver ,uma molécula de DNA delimitada em suas extremidades por adaptadores, os quais se ligarão os nucleotídeos fixados na flowcell (base cinza). Em B a ilustração da PCR em ponte. Em C a formação dos clusters. Em D, a representação da leitura das fluorescências dos nucleotídeos pelo equipamento HiSeq, o qual é capaz de identificar e ler quatro fluorescências (o equipamento NextSeq é capaz de reconhecer e ler duas fluorescências).

O preparo das amostras a serem sequenciadas foi feito de acordo com o protocolo *NextSeq System Denature and Dilute Libraries Guide Protocol A (Document #15048776 v02)*, onde neste, as amostras com a concentração inicial de 4nM foram colocadas juntas em um mesmo tubo, formando um *pool* também a 4nM. Após isso, diluições foram realizadas para que o *pool* final, com uma concentração de 1,8 pM, fosse colocado no cartucho e inserido na máquina para iniciar o sequenciamento.

O sistema *NextSeq*, com a utilização do kit *Mid Output* configurado para realizar o sequenciamento do tipo *paired-end* de fragmentos (*reads*) com 150 pares de base (2 x 150), o qual foi utilizado neste trabalho, é capaz de gerar até 260 milhões de reads em um total de 39 Gb de dados.

### **3.4 ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA**

Os dados gerados foram analisados pelo grupo de Bioinformática do Centro de Pesquisa do A.C.Camargo Cancer Center coordenado pelo Pesquisador Dr. Israel Tojal da Silva, e também pelo bioinformata Dr<sup>o</sup> Rodrigo Ramalho.

#### **3.4.1 Alinhamento das sequências**

A partir dos arquivos fastQ gerados pela corrida de sequenciamento, utilizamos duas metodologias distintas de alinhamento no genoma referência Hg 19 (*Genome Reference Consortium GRCh37*). Uma delas foi a utilização do algoritmo *Burrows-Wheeler Aligner* (BWA – versão 0.7.15-r1140) e a

outra o *Smith-Waterman*, o qual estava disponível no sistema da empresa *Illumina* (*Basespace*) integrado a um aplicativo, *TruSeq Amplicon*. Este aplicativo foi desenvolvido para realizar uma análise simplificada de painéis que utilizam a metodologia *TruSeq Amplicon*, e o mesmo estava disponível no *Basespace*, base onde ficam armazenados os dados das corridas por usuário e os demais aplicativos disponibilizados pela *Illumina*.

A análise dos dados gerados a partir do *BWA* foi feita com a utilização do software *Samtools*, o qual disponibiliza várias ferramentas para análise de dados de alinhamento (<http://samtools.sourceforge.net/>), e a análise dos dados do *Smith-Waterman* foi realizada pelo próprio aplicativo *TruSeq Amplicon*.

De forma a contemplar e otimizar o alinhamento das sequências R1 e R2 geradas pelo sequenciamento *paired end*, todos os *reads*, 1 e 2, foram agrupados previamente ao mapeamento no genoma humano, o qual foi realizado a partir da utilização da ferramenta *BWA*.

### **3.4.2 Chamada e anotação das variantes somáticas**

Para a detecção das variantes somáticas, as sequências alinhadas foram inseridas no programa *MuTect* (<http://archive.broadinstitute.org/cancer/cga/mutect>), o qual realiza a comparação dos dados do tumor e da amostra normal de forma pareada, utilizando os parâmetros *default*. Para este trabalho, realizamos a chamada de variantes somáticas de 33 amostras pareadas (tumor/normal) e 8 tumores, onde nestes, utilizamos um *pool* de todas as amostras normais

para a comparação. Para os tumores que utilizamos o *pool* das amostras normais, aplicamos como critério de chamada onde a posição chamada no tumor, poderia estar presente em no máximo duas amostras normais. Caso a posição chamada estivesse em mais de duas amostras do *pool*, o programa deveria excluir esta posição.

Os arquivos do tipo VCF (do inglês, *Variant Calling Files*) gerados pelo *Mutect* foram carregados no programa Varseq® versão 1.4.2 (<http://goldenhelix.com/products/VarSeq/>), no qual, a partir da utilização de filtros, selecionamos e anotamos as variantes somáticas. Os filtros utilizados foram aqueles referentes à qualidade da variante chamada, à frequência da mesma na amostra tumoral e na normal, ao efeito dela no gene e à cobertura do sequenciamento dessa região em ambas as amostras.

Para ser selecionada, a variante deveria estar contida dentro dos seguintes filtros no arquivo VCF:

- Filtros de qualidade: PASS (variantes que passaram por todos os filtros de qualidade), ALT\_ALLELE\_IN\_NORMAL (evidência por estar presente na amostra normal), GERMILINE\_RISK (evidências de que esta variante pode não ser somática);
- Filtros de coberturas: na amostra tumoral a cobertura teria que ser  $\geq 80X$  e na normal  $\geq 20X$ .
- Filtros de frequência: na amostra tumoral  $\geq 2\%$  e na normal  $\leq 0,005\%$ ;
- Filtros de efeitos: perda de sentido (*missense*) e perda de função (*Loss of function*);

Os filtros de qualidade foram escolhidos após analisar de forma precisa quais seriam os mais adequados, evitando que alguma variante interessante pudesse ser perdida.

### **3.4.3 Análise de vias e ontologia (KEGG e Gene Ontology)**

As análises de vias e ontologias foram feitas com a ferramenta *online WebGestalt (WEB-based Gene Set Analysis Toolket* - <http://webgestalt.org/option.php>), a qual trata-se de realizar análises de enriquecimento a partir de comparações entre dados de interesse com banco de dados, como por exemplo, GO (*Gene Ontology*) e KEGG (ZHANG et al. 2005; WANG et al. 2013).

Para estas análises, selecionamos os genes que apresentaram mutações em no mínimo 10% de todas as amostras (35) (21 genes), e para a análise dos grupos com e sem recidiva, selecionamos os genes mutados em pelo menos 20% amostras (8 genes) de cada grupo.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 SELEÇÃO DOS PACIENTES

Foram selecionados inicialmente 66 pacientes com adenocarcinoma de próstata com escore de Gleason 7 e 8, submetidos a PR no A.C. Camargo Cancer Center. Dentre estes, 27 pacientes apresentaram recidiva bioquímica da doença e 39 não apresentaram recidiva bioquímica. Foram incluídos no grupo de recidiva bioquímica os pacientes que apresentaram margens cirúrgicas livres de neoplasia e sem acometimento linfonodal, queda do PSA sérico após a cirurgia e a sua re-deteção em níveis séricos  $\geq 0,2$  ng/mL. Já os pacientes sem recidiva bioquímica que foram incluídos, apresentaram PSA sérico menor que 0,2 ng/mL em todas as avaliações pós cirúrgicas em um período mínimo de 4 anos.

Após a triagem dos pacientes de acordo com os critérios clínicos presentes nos prontuários 43 pacientes foram selecionados para o estudo, dentre estes, 21 com recidiva bioquímica e 22 sem recidiva bioquímica (**Quadro 13 e Anexo 2**). Os dois grupos de pacientes estão equilibrados em relação a demais características clínicas e histopatológicas como idade de acometimento, volume do tumor, escore de Gleason e PSA pré-cirúrgico.

**Quadro 13** - Distribuição dos casos selecionados para o estudo.

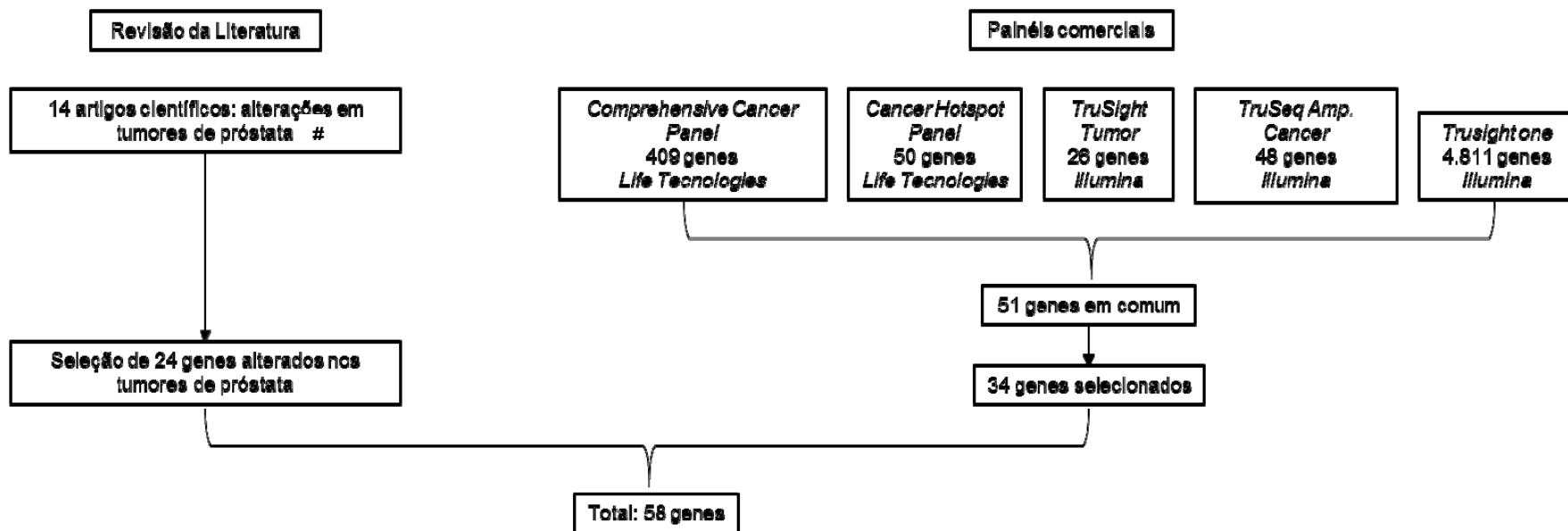
<b>Com recidiva (21 casos)</b>	<b>Sem recidiva (22 casos)</b>
<b>Idade (anos)</b>	<b>Idade (anos)</b>
Média: 62	Média: 58
Mín.: 50	Mín.: 42
Máx.: 76	Máx.: 67
<b>Tempo de seguimento (anos)</b>	<b>Tempo de seguimento (anos)</b>
Média: 5	Média: 7
Mín.: 2	Mín.: 4
Máx.: 11	Máx.: 11
<b>Volume do tumor (%)</b>	<b>Volume do tumor (%)</b>
Média: 8,24%	Média: 9%
Mín.: 1,75%	Mín.: 0,5%
Máx.: 15%	Máx.: 26,5%
<b>Escore Gleason da peça</b>	<b>Escore Gleason da peça</b>
3+4: 11	3+4: 17
4+3: 8	4+3: 5
3+5: 1	
5+3: 1	
<b>PSA pré cirúrgico (ng/mL)</b>	<b>PSA pré cirúrgico (ng/mL)</b>
Média: 6,74	Média: 6,30
Mín.: 3,11	Mín.: 2,19
Máx.: 11,70	Máx.: 15,67
<b>Óbitos</b>	<b>Óbitos</b>
2	0
<b>Metástase (óssea)</b>	<b>Metástase (óssea)</b>
3	0

## 4.2 SELEÇÃO DOS GENES E CUSTOMIZAÇÃO DO PAINEL

Para a seleção dos genes a serem inseridos no painel customizado, realizamos uma revisão bibliográfica de alterações somáticas reportadas em tumores de próstata e, baseado nos dados de 14 artigos escolhidos, selecionamos 24 genes descritos como alterados em CaP. Em seguida, fizemos um levantamento de 5 painéis comerciais contendo genes frequentemente mutados em tumores sólidos. A partir de uma análise comparativa entre estes painéis, separamos 34 genes dentre a lista de 51 genes comumente encontrados nos mesmos para inclusão no painel totalizando 58 genes. (**Figura 6**).

O painel foi desenhado de forma a cobrir toda a região codificante de 40 genes e regiões *hotspots* dos demais 18 genes (**Anexo 3**). O desenho final do painel customizado apresentou um total de 1.502 *amplicons* com tamanho de aproximadamente 250 pares de base (pb) cada, totalizando 213.081 bases, que abrangem 96% de cobertura horizontal de todos os alvos.





**Figura 6** - Seleção dos genes inseridos no painel.

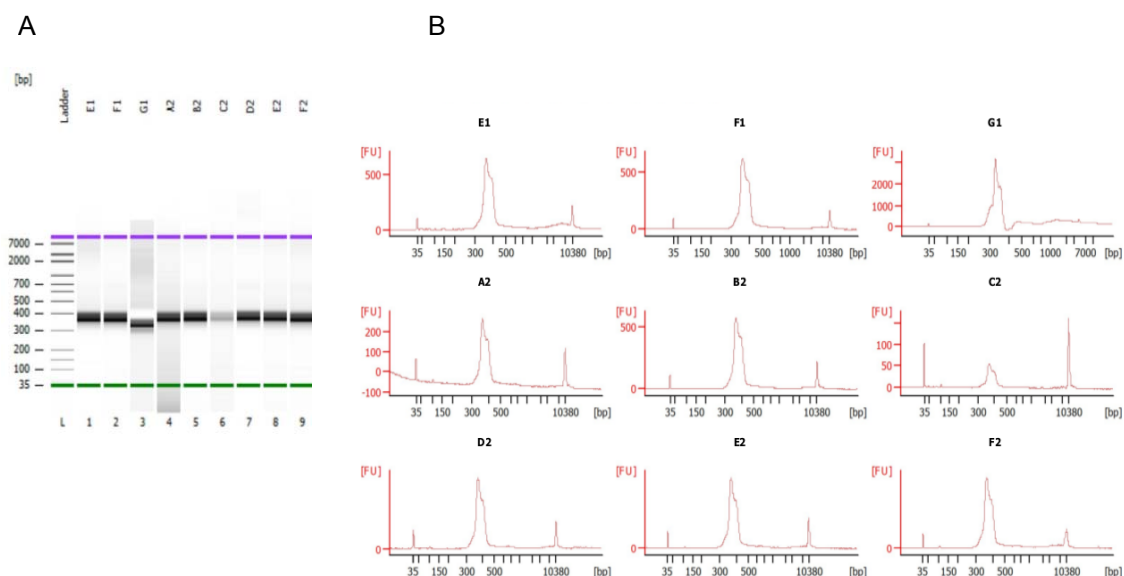
**Legenda:** # - Referências dos genes selecionados: Grasso et al. 2012, Chang et al. 2004, Yadav et al. 2015, Barbieri et al. 2012, Stein et al. 2014, Manson-Barh et al. 2014, Gordon et al. 2015, Huang et al. 2015, Robbins et al. 2011, Kumar et al. 2011, Wong et al. 2007, Tomlins et al. 2011, Cavanagh et al. 2015 e Narod et al. 2008.

## 4.3 SEQUENCIAMENTO DAS AMOSTRAS

### 4.3.1 Preparo das bibliotecas

Foram utilizados 250 ng do DNAg extraído do tumor, leucócito ou borda normal adjacente, para construção das bibliotecas com a inserção de índices únicos para cada amostra (**Quadro 14**) de acordo com o protocolo *TruSeq Custom Amplicon Library Preparation* (TSCA – Catálogo FC-130-9005DOC; Rev.C), como descrito na sessão 3.3.2 de Materiais e Métodos.

Para verificar o rendimento e o tamanho dos fragmentos das 78 bibliotecas (35 pares tumor e normal e 8 tumores não pareados), estas foram avaliadas pelos equipamentos *Qubit® Fluorometer* e *Agilent 2100 Bioanalyzer* (*Agilent Technologies*) usando o kit *High Sensitivity DNA Analysis*. Estas avaliações mostraram que as bibliotecas geraram fragmentos de tamanho esperado, em torno de 370 pb (250 pb do amplicon + adaptadores), sem a formação de dímeros de adaptadores (ausência do pico com aproximadamente 120 pb) e bom rendimento em relação à concentração (**Figura 7** e **Quadro 14**), estando apropriadas para o sequenciamento.



**Figura 7** - Avaliação das bibliotecas. Exemplo dos perfis de distribuição dos fragmentos de nove bibliotecas pelo *Bionalyzer*. **(A)** Imagem digital do gel mostrando as bandas dos fragmentos em torno de 350 – 370 pb. **(B)** Eletroferogramas mostrando o perfil de distribuição dos fragmentos por tamanho (eixo X) e quantidade por unidades de fluorescência (eixo Y).

**Quadro 14** - Relação dos índices utilizados por amostra, quantificação das bibliotecas e tamanho dos fragmentos das mesmas.

Pares	ID Amostra	ID Biblioteca	Concentração (ng/uL)	Índices	Fragmentos (pb)
Par 01	T01	A01	12,70	A501/A701	391
	SG01	A02	1,67	A501/A702	380
Par 02	T02	B01	4,14	A502/A701	390
	SG02	B02	1,31	A502/A702	383
Par 03	T03	C01	24,20	A503/A701	388
	SG03	C02	0,23	A503/A702	382
Par 04	T04	D01	1,16	A504/A701	386
	SG04	D02	1,95	A504/A702	387
Par 05	T05	E01	3,81	A505/A701	394
	SG05	E02	2,17	A505/A702	387
Par 06	T06	A05	36,60	A501/A705	379
	SG06	A06	59,30	A501/A706	380
Par 07	T07	B11	58,00	A502/A711	386
	SG07	B05	1,43	A502/A705	378
Par 09	T09	H09	14,60	A508/A709	387
	SG09	H11	32,90	A508/A711	378
	T10	F01	1,64	A506/A701	381
	B10	F02	2,57	A506/A702	379

## Cont/Quadro 14

Pares	ID Amostra	ID Biblioteca	Concentração (ng/uL)	Índices	Fragmentos (pb)
Par 12	T12	H10	74,50	A508/A710	384
	SG12	A03	0,79	A501/A703	383
Par 13	T13	G07	23,30	A507/A707	382
	SG13	C12	13,30	A503/A712	383
Par 14	T14	A08	30,90	A501/A708	382
	SG14	C06	0,88	A503/A706	380
Par 15	T15	B08	27,50	A502/A708	383
	SG15	B03	0,47	A502/A703	379
Par 16	T16	C11	64,40	A503/A711	385
	SG16	B12	15,70	A502/A712	381
Par 17	T17	F12	9,75	A506/A712	379
	SG17	F11	16,10	A506/A711	378
Par 18	T18	E08	34,20	A505/A708	382
	SG18	C04	0,62	A503/A704	385
Par 19	T19	E07	9,57	A505/A707	384
	SG19	D03	0,35	A504/A703	382
Par 20	T20	F07	55,00	A506/A707	380
	SG20	D04	1,45	A504/A704	384
Par 21	T21	G08	16,10	A507/A708	380
	SG21	E03	1,38	A505/A703	380
Par 22	T22	F08	18,40	A506/A708	380
	SG22	E04	1,46	A505/A704	382
Par 23	T23	H08	10,80	A508/A708	380
	SG23	F04	0,54	A506/A704	378
Par 24	T24	C07	31,60	A503/A707	385
	SG24	G03	1,18	A507/A703	381
Par 25	T25	D07	14,60	A504/A707	383
	SG25	G04	0,82	A507/A703	384
Par 26	T26	D09	36,90	A504/A709	379
	SG26	E11	21,90	A505/A711	379
Par 27	T27	D12	5,95	A504/A712	382
	SG27	H04	0,43	A508/A704	385
Par 28	T28	F09	27,50	A506/A709	382
	SG28	A12	18,90	A501/A712	383
Par 29	T29	G09	7,23	A507/A709	382
	SG29	E12	14,60	A505/A712	378
Par 30	T30	A11	56,40	A501/A711	387
	B30	E05	2,13	A505/A705	375
Par 31	T31	A09	54,60	A501/A709	375
	B31	E06	1,89	A505/A706	386
Par 32	T32	C09	52,50	A503/A709	387
	B32	F05	8,99	A506/A705	375
Par 33	T33	B07	34,30	A502/A707	387
	B33	G11	22,50	A507/A711	379
Par 34	T34	H07	39,90	A508/A707	380
	SG34	H06	5,17	A508/A706	380
Par 35	T35	B09	27,80	A502/A709	380
	B35	G12	64,30	A507/A712	380
-	T36	H12	50,20	A508/A712	380
-	T37	G05	2,41	A507/A705	389
-	T38	E10	56,30	A505/A710	387
-	T39	F10	64,40	A506/A710	388
-	T40	G10	59,00	A507/A710	388
-	T41	G06	4,53	A507/A706	379
-	T42	B10	30,00	A502/A710	386
-	T43	C10	19,30	A503/A710	382

Após a confirmação de que as amostras estavam de acordo com o padrão esperado, quantidades equimolares de cada amostra foram misturadas para o sequenciamento em uma única *flowcell* (*Midoutput*) na plataforma *NextSeq 500* (*Illumina*).

## **4.4 ANÁLISE DOS DADOS DE SEQUENCIAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DAS VARIANTES SOMÁTICAS**

### **4.4.1 Análise de mapeamento das sequências**

O sequenciamento das 78 amostras (35 pares + 8 amostras tumorais não pareadas), gerou aproximadamente 280 milhões de sequências, com uma média de aproximadamente 3,5 milhões de sequências por amostra, sendo 72,2% delas com ótima qualidade ( $\geq Q30$ ).

Dois amostras apresentaram resultados distintos das demais. A amostra SG08 (leucócito), teve pouca representatividade no sequenciamento, gerando apenas 2.052 sequências com uma média de cobertura por base de 0,42X. Já a amostra T11 (tumor), foi super-representada, gerando 2.464.828 sequências com cobertura de 28.586X por base. Sendo assim, devido a este problema de representatividade e consequentemente de cobertura, decidimos excluir estas amostras para que estas não enviesassem nossos resultados nas chamadas de variantes e nas comparações entre os grupos com e sem recidiva.

As sequências foram mapeadas no genoma referência versão Hg 19 (*Genome Reference Consortium GRCh37*) com o *software* *BWA*.

Observamos que, em média, 92% das sequências foram mapeadas no genoma humano referência e 91% foram mapeadas nas regiões delimitadas pelo painel (arquivo BED). De forma geral, as amostras foram bem cobertas, apresentando uma média de profundidade de cobertura maior que 1.000X (**Tabela 1**).

**Tabela 1** - Total de sequências geradas e mapeadas no genoma humano com a ferramenta *BWA* para cada amostra. Em cinza, estão as amostras excluídas por terem sido super-representadas e pouco representada no sequenciamento, T11 e SG08, respectivamente.

ID Amostra	TOTAL (fastq)	Média de cobertura por base	Mapeamento na região alvo	
			% Sequências mapeadas	Cobertura horizontal em 100X (%)
T01	5047198	2154	94,08	97,29
SG01	2904372	1245	94,38	95,18
T02	2295880	977	93,78	95,25
SG02	2847774	1221	94,36	95,78
T03	2413714	1030	94,02	95,91
SG03	1235670	524	93,32	87,33
T04	2793324	1112	87,69	95,58
SG04	2927498	1253	94,20	94,39
T05	2227970	949	93,81	94,32
SG05	3312036	1421	94,44	96,44
T06	2386378	986	91,06	69,24
SG06	2457964	1016	91,12	85,74
T07	2993668	1274	93,93	96,17
SG07	2529048	1044	90,85	53,73
T08	2067942	866	92,46	90,17
SG08	2052	0	48,64	0,00
T09	2823462	1191	93,04	91,95
SG09	2494318	1043	92,24	88,65
T10	2495852	1064	93,88	95,31
B10	2479228	1063	94,37	94,32
T11	67116520	28587	93,95	99,54
B11	2464828	1060	94,69	94,79
T12	2896876	1240	94,29	95,97
SG12	2770608	1155	91,83	87,46
T13	2472574	1035	92,38	86,60

Cont/ Tabela 1

ID Amostra	TOTAL (fastq)	Média de cobertura por base	Mapeamento na região alvo	
			%Sequências mapeadas	Cobertura horizontal em 100X (%)
SG13	2649646	1121	93,24	86,47
T14	2130564	888	92,08	87,79
SG14	2852684	1043	80,78	92,94
T15	2641396	1099	91,82	90,36
SG15	2901522	1199	91,01	89,44
T16	3017728	1282	93,79	96,50
SG16	2332156	987	93,33	86,53
T17	2473448	1044	93,00	87,59
SG17	2840956	1209	93,73	72,87
T18	2388716	995	92,01	93,20
SG18	1425432	586	90,57	84,49
T19	2324216	963	91,47	90,96
SG19	3875200	1430	81,24	91,42
T20	2837186	1196	92,98	86,27
SG20	2720326	1143	92,63	92,41
T21	2295606	962	92,55	91,02
SG21	3111698	1299	91,96	93,60
T22	3005672	1261	92,61	92,81
SG22	2445034	1032	93,02	92,87
T23	2716874	1137	92,38	88,98
SG23	3628076	1501	91,26	93,66
T24	4604368	1929	92,50	95,18
SG24	3360672	1401	91,84	93,14
T25	2482006	1036	92,15	90,36
SG25	2506648	1033	90,91	90,96
T26	3058440	1279	92,19	94,19
SG26	4445702	1874	92,93	67,85



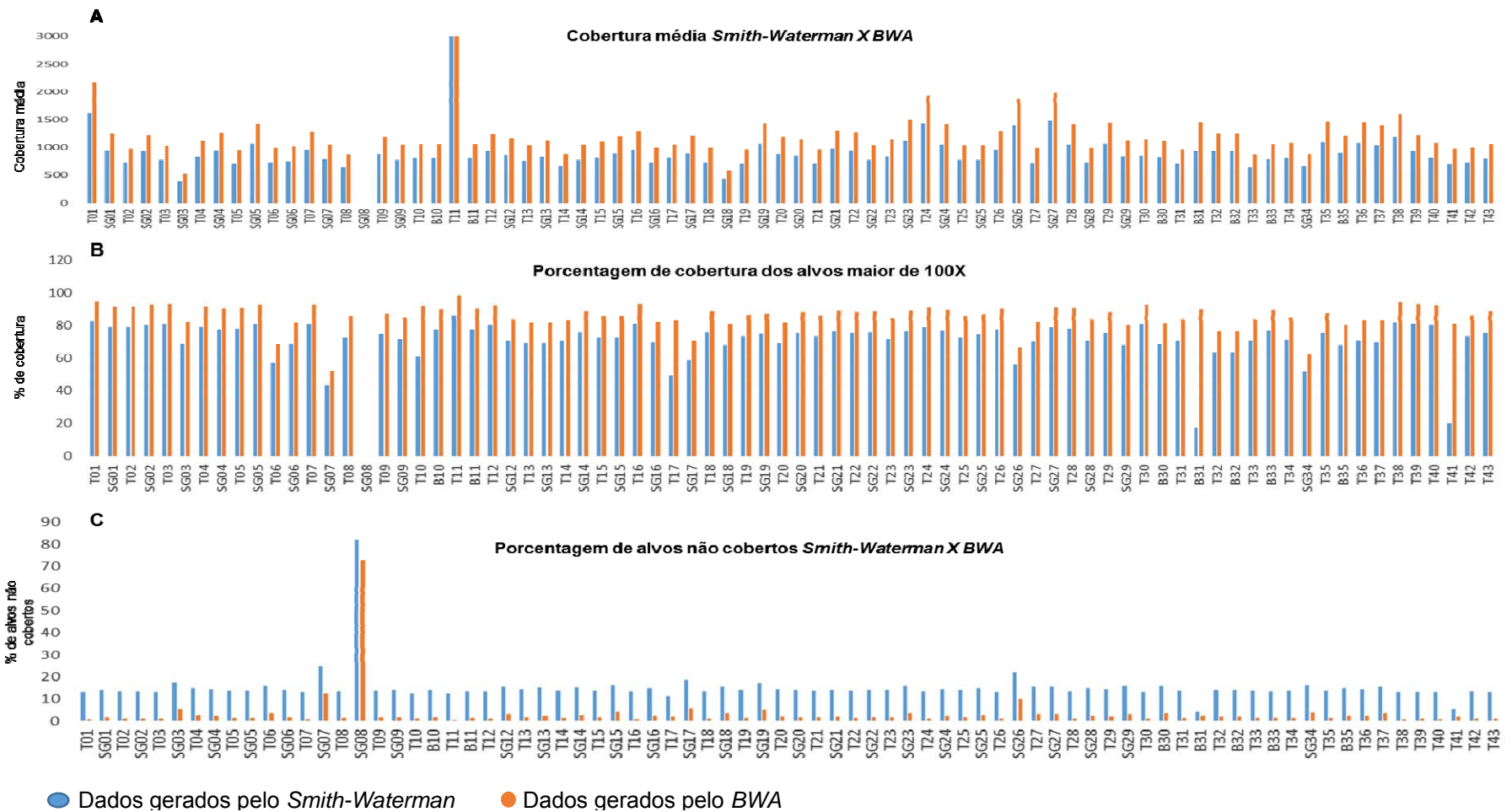
Cont/ Tabela 1

ID Amostra	TOTAL (fastq)	Média de cobertura por base	Mapeamento na região alvo	
			%Sequências mapeadas	Cobertura horizontal em 100X (%)
T27	2326326	981	92,89	86,93
SG27	4879050	1979	89,43	95,45
T28	3334110	1405	92,91	94,52
SG28	2368590	984	91,56	87,06
T29	3450586	1438	91,91	92,94
SG29	2908702	1126	85,33	83,70
T30	2683936	1141	93,92	96,30
B30	2617388	1104	92,97	86,14
T31	2284034	962	92,84	87,72
B31	3465728	1453	92,52	94,06
T32	2132904	760	78,17	90,36
B32	2932202	1244	93,50	80,46
T33	2053258	864	83,58	92,81
B33	2523014	1054	92,25	93,53
T34	2574138	1076	84,18	92,18
SG34	2104688	886	92,76	63,70
T35	3488776	1462	92,34	92,34
B35	2860062	1215	93,57	84,62
T36	3400974	1447	93,70	87,99
T37	3838638	1389	82,83	79,77
T38	3753122	1595	93,62	56,77
T39	2860382	1223	94,25	96,37
T40	2519354	1077	94,23	96,30
T41	2340582	977	92,06	84,88
T42	2345186	987	92,84	90,89
T43	2519278	1058	92,60	93,00

#### 4.4.2 Comparação entre dois *pipelines* para mapeamento e chamada de variantes

Foram testados dois *pipelines* distintos para identificação de variantes somáticas: o *software MuTect* (CIBULSKIS et al. 2013) e o aplicativo *Somatic* (*Illumina*). O *software MuTect* é uma ferramenta disponibilizada pela equipe do *Broad Institute* para chamada de variantes somáticas que utiliza como base o mapeamento feito pelo *software BWA*, refaz um alinhamento local e realiza chamada de variantes comparativa entre uma amostra teste (tumor) e uma amostra referência (normal). O aplicativo *Somatic* disponibilizado pela *Illumina* realiza o mapeamento das sequências com a ferramenta *Smith-Waterman*, seguida da chamada de variantes de cada amostra individualmente. É um aplicativo fechado que possibilita pouca customização.

Após a etapa de alinhamento, verificamos que o alinhador *BWA* apresentou porcentagens de cobertura média por base superiores ao alinhador *Smith-Waterman* em todas as amostras (**Figura 8A**), bem como maiores valores de porcentagem de alvos com cobertura média acima de 100x (**Figura 8B**). Além disso, quando comparamos os alvos não cobertos, observamos que o alinhador do aplicativo (*Smith-Waterman*) teve uma maior porcentagem de alvos não cobertos em todas as amostras (**Figura 8C**).



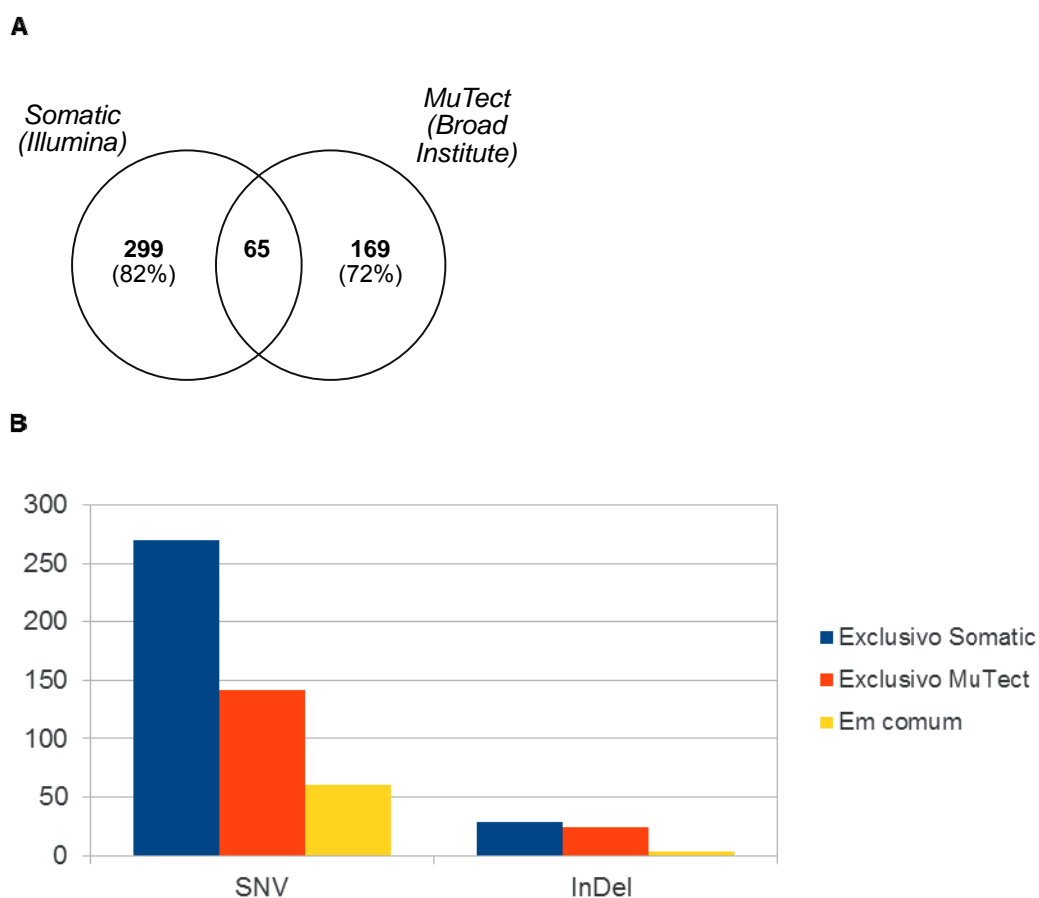
**Figura 8** - Gráfico de barras mostrando a comparação entre os alinhadores utilizados no estudo, em azul os dados referentes ao alinhador *Smith-Waterman* e em laranja ao *BWA*. **(A)** Distribuição da cobertura média por base entre os alinhadores, por amostra. **(B)** Porcentagem de alvos cobertos mais de 100x. **(C)** Distribuição, por amostra, dos alvos não cobertos pelos alinhadores.

A etapa de chamada de variantes foi realizada para todas as amostras pareadas, exceto para os casos 08 e 11, devido a problemas de representatividade no sequenciamento. As variantes identificadas com cada *software* foram listadas em arquivos de extensão VCF (do inglês, *Variant Call File*) e avaliados pelo programa *VarSeq (Golden Helix)* versão 1.4.3 para anotação e filtragem das variantes possivelmente somáticas com impacto na proteína.

Um total de 234 variantes foram identificadas pelo *MuTect* e 364 foram identificadas pelo aplicativo *Somatic* para as 33 amostras pareadas, 15 com recidiva bioquímica e 18 sem recidiva. Dentre as variantes identificadas pelo *software MuTect*, 203 foram classificadas como SNV (do inglês, *Single Nucleotide Variant*) e 31 como InDel (inserção ou deleção de uma base e/ou seguimento de sequência), e, em relação ao efeito da alteração, 187 foram classificadas como *missense* (substituição de um aminoácido ou deleção ou inserção *in frame*) e 47 como perda de função (LoF, do inglês *Loss of Function* – incluindo alterações *nonsense*, em sítio de *splice* e inserções e deleções *frameshift*). Dentre as variantes identificadas pelo aplicativo *Somatic*, 331 foram do tipo SNV e 33 InDel, e em relação ao efeito da alteração, 304 foram classificadas como *missense* e 60 como LoF. Um caso (Par 07 – sem recidiva) não apresentou variante somática pelas ferramentas utilizadas.

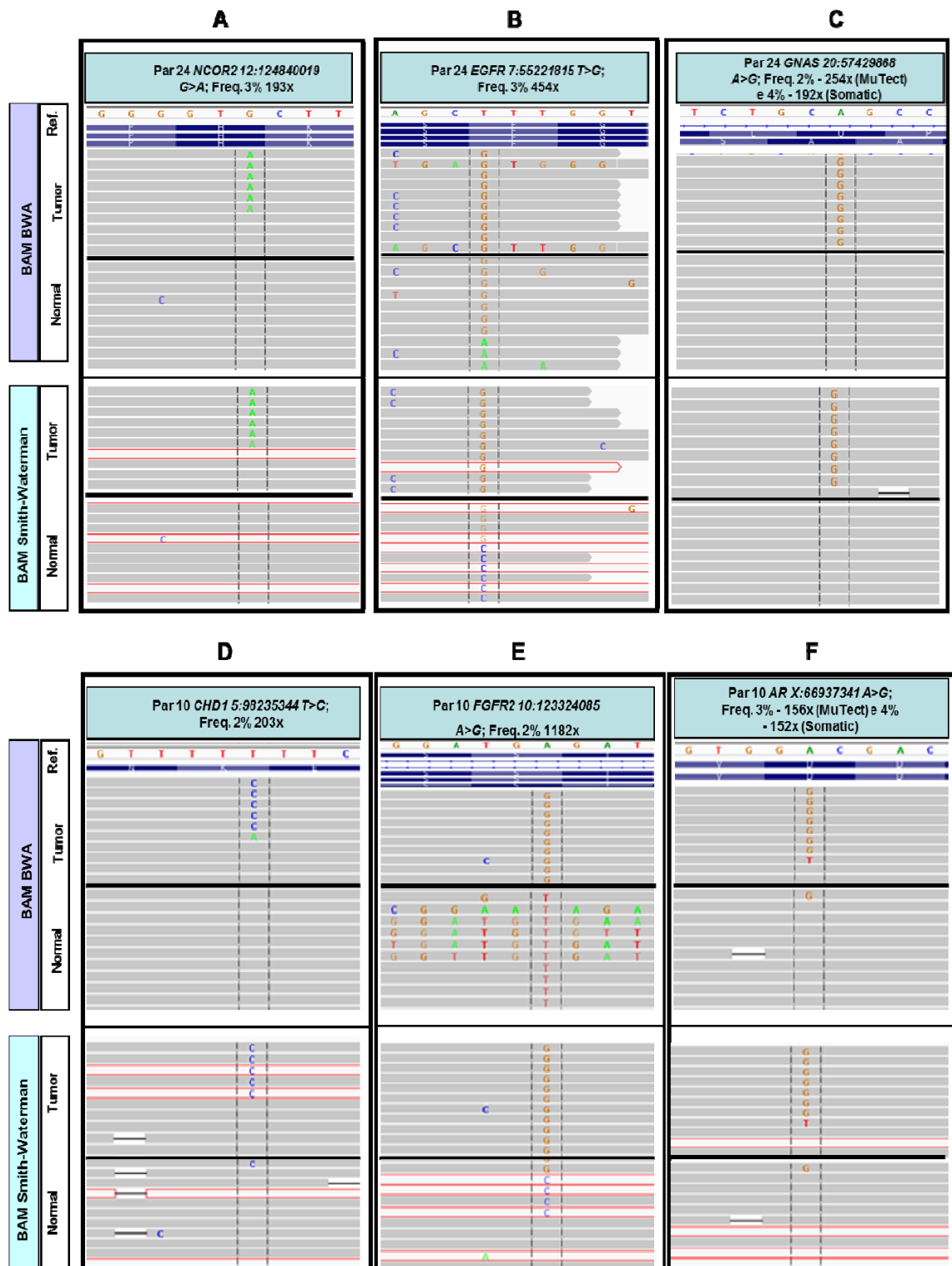
Quando comparamos a concordância das alterações somáticas identificadas (pela comparação das coordenadas genômicas das mesmas), encontramos que 28% das variantes chamadas pelo *MuTect* e apenas 18%

das variantes chamadas pelo Somatic eram comuns aos dois aplicativos (**Figura 9A**). Das 65 posições que estão em comum, 61 são alterações do tipo SNV e 4 InDel. Das posições encontradas como exclusivas na análise feita pelo aplicativo Somatic, 270 são SNV e 29 InDel, e as exclusivas da análise do MuTect 142 são SNV e 24 InDel (**Figura 9B**).



**Figura 9** - Comparação entre as duas metodologias utilizadas para a chamada de variantes. **(A)** Diagrama de Venn ilustrando que apenas 65 das variantes chamadas encontravam-se em comum entre as duas metodologias. **(B)** Gráfico de barras mostrando a diferença entre os valores totais de SNVs e InDels encontrados por cada chamador.

Devido a esta diferença de variantes listadas entre essas duas metodologias, fizemos uma inspeção manual utilizando o programa IGV (do inglês, *Integrative Genomics Viewer* – <http://software.broadinstitute.org/software/igv/>), com o objetivo de avaliar a qualidade das sequências alinhadas nas posições onde foram chamadas as alterações. Para isso, selecionamos 10 alterações que foram chamadas de forma exclusiva por um dos dois pipelines e 10 alterações chamadas de forma comum, e avaliamos o resultado do mapeamento pelos dois *softwares*, *BWA* (utilizado pelo *MuTect*) e *Smith-Waterman* (utilizado pelo *Somatic*). Na Figura 10 podemos observar a diferença da qualidade do alinhamento das variantes chamadas por cada *pipeline*. De forma geral, a qualidade do mapeamento foi melhor com o alinhador *BWA*. O mapeamento do alinhador *Smith-Waterman* mostra presença de sequências de baixa qualidade, representadas pelos retângulos vermelhos, em todas as amostras. Além disso, nos dois exemplos de alterações exclusivamente chamadas pelo *pipeline Somatic* (**Figura 10B e 10E**) podemos ver a presença de sequências variantes na amostra normal, sugerindo ser variantes falso-positivas. Por outro lado, as variantes exclusivamente chamadas pelo *pipeline MuTect* (figura 9A e 9D) estão em sequências de boa qualidade, sem alterações nas bases vizinhas e não encontradas na amostra normal pareada, tendo características parecidas com as alterações comuns chamadas pelos dois *pipelines* (**Figura 10C e 10F**), sugerindo serem variantes reais.



**Figura 10** - Imagens dos alinhamentos das seqüências vistas pelo visualizador IGV. Na parte superior das ilustrações temos a seqüência das bases da referência. Mais abaixo, cada retângulo cinza representa uma seqüência individual gerada com boa qualidade pelo sequenciamento, os retângulos em vermelho representam

sequências de baixa qualidade e as bases em destaque são as que diferem da referência. A linha pontilhada ressalta a posição onde foi encontrada a variante. Na parte lateral da figura temos a discriminação da metodologia utilizada no alinhamento, lateral/superior *BWA* e lateral inferior Smith-Waterman. **(A)** Par 24, variante chamada apenas pelo *MuTect*. Troca no gene *NCOR2* de G>A em uma frequência de 3% com profundidade de cobertura de 193X. Na parte superior o alinhamento pelo *BWA* e inferior pelo *Smith Waterman*. **(B)** Par 24, variante chamada apenas pelo *Somatic*. Troca no gene *EGFR* de T>G em uma frequência de 3% com profundidade de cobertura de 454X. Parte superior e inferior, alinhamento com *BWA* e *Smith-Waterman*, respectivamente. **(C)** Par 24, variante chamada pelas duas metodologias. Troca no gene *GNAS* de A>G, chamada pelo *MuTect* em uma frequência de 2% com profundidade de cobertura de 254X, e pelo *Somatic* em uma frequência de 4% e cobertura de 192X. **(D)** Par 10, variante chamada apenas pelo *MuTect*. Troca no gene *CHD1* de T>C em uma frequência de 2% e cobertura de 203X. **(E)** Par 10, variante chamada apenas pelo *Somatic*. Troca no gene *FGFR2* de A>G com frequência de 2% e cobertura de 1.182X. **(F)** Par 10, variante chama pelas duas metodologias. Troca de A>G no gene *AR*, chamada pelo *MuTect* em uma frequência de 3% com cobertura de 156X, e pelo *Somatic* em 4% com cobertura de 152X.

De forma geral, observamos que a maioria das variantes que foram chamadas apenas pelo *Somatic*, estavam contidas na chamada inicial do *Mutect*, porém foram filtradas por estarem classificadas nos filtros *clustered events* que são alterações em regiões próximas, as quais podem ser chamadas de forma artefactual por estarem em uma região ruim do sequenciamento, e *t lod fstar*, o qual trata-se de um filtro que leva em consideração a probabilidade do genótipo chamado estar correto. Quando avaliamos as variantes chamadas apenas pelo *Mutect*, observamos que a maioria das posições não estavam presentes no arquivo VCF gerado pelo *software Somatic* e não temos como avaliar se foram descartadas por algum filtro específico durante o processamento.

Sendo assim, decidimos utilizar neste estudo os dados gerados a partir do *software MuTect*, pois além dessas evidências relatadas aqui, o

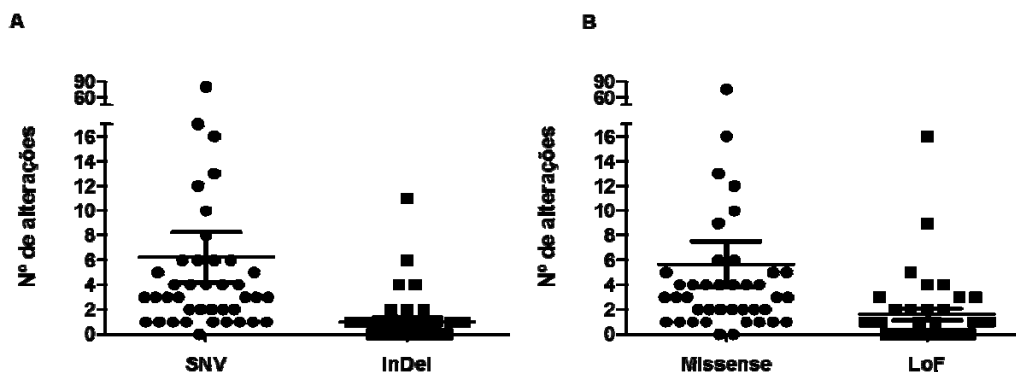


BWA é um alinhador bem estabelecido e o *MuTect* foi descrito como software com sensibilidade de 77% a 87% na identificação de variantes somáticas quando comparado com outros nove softwares desenvolvidos para identificar mutações somáticas (CIBULSKIS et al. 2013; KRØIGÅRD et al. 2016).

#### **4.4.3 Perfil mutacional de tumores de próstata de escore de Gleason intermediário**

A análise de perfil mutacional foi, portanto, realizada em 41 casos de tumores de próstata com escore de Gleason intermediário, utilizando as ferramentas *BWA*, *MuTect* e *VarSeq*. Para este trabalho, utilizamos 33 amostras pareadas (tumor/normal) e 8 tumores não pareados. Para estes, na etapa de chamada de variantes, utilizamos um pool de todas as amostras normais de forma a aumentar a confiabilidade da chamada.

Foi identificado um total de 292 variantes somáticas (**Anexo 4**), com uma média de 7 variantes por caso (mínimo de 0 e máximo de 91). Deste total de variantes identificadas, 250 eram SNV e 42 InDel (**Figura 11A**), sendo 226 classificadas como *missense* e 65 como LoF (**Figura 11B**).



**Figura 11** - Box plot com a representação do número de alterações por amostra. **(A)** Alterações do tipo SNV e InDel por amostra. **(B)** Alterações do tipo missense e LoF.

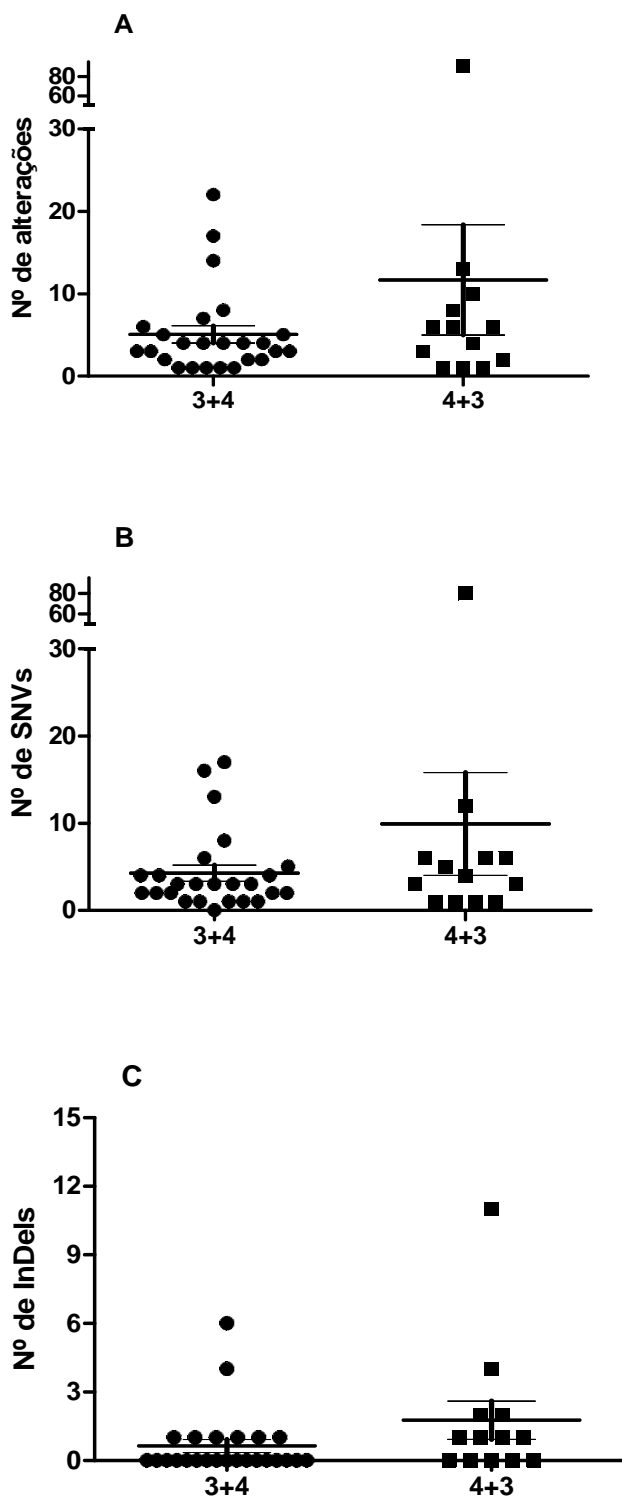
O pequeno número de mutações somáticas identificadas para os tumores investigados neste estudo, com exceção de alguns casos, principalmente o T04, está de acordo com dados da literatura que demonstram que os adenocarcinomas de próstata são tumores com pequeno número de alterações somáticas (KAN et al. 2010). O tumor T04 (91 mutações somáticas) pode representar um de caso de tumor hipermutado, e casos como estes vêm sendo encontrados e correlacionados com perfis genômicos específicos (FRASER et al. 2017).

A maioria das mutações apresentou baixa frequência, sendo 95% das mutações detectadas em frequência menor que 10%. No entanto identificamos quatro variantes com frequências próximas a 50% (entre 43% e 55%) e uma mutação em homozigose, com frequência da variante de 99%. Uma das mutações com frequência de 45% e a mutação em homozigose foram descritas em um tumor, T02, o qual compõe o segundo par com maior número de mutações (total de 17 alterações). Tumores com alto número de alterações apresentam em geral grande instabilidade cromossômica,

apresentando alterações estruturais no genoma em número de cópias, podendo resultar em eventos de perda de heterozigose, o que poderia explicar a ocorrência de mutações em homozigose.

Por outro lado, as outras três alterações em frequências próximas a 50% foram detectadas em amostras tumorais não pareadas. Pelo fato de o método utilizado para a chamada de somáticas ter utilizado o conjunto das demais amostras normais para filtrar variantes polimórficas encontradas nestes tumores, como não foi possível utilizar uma amostra normal pareada do mesmo paciente é possível que algumas variantes germinativas do paciente, não tenham sido corretamente descartadas. Duas destas, foram variantes detectadas no gene *BRCA2*, p.Lys3326Ter (rs11571833) e p.Ile2490Thr (rs11571707), estão descritas no banco de dados dbSNP como polimorfismos benignos, reforçando a sugestão de tratarem-se de polimorfismos germinativos. A variante encontrada no gene *CHD5* com frequência de 55%, p.Ser259Cys (rs140726881), também foi descrita no dbSNP com ocorrência na população de 0,2% também sugerindo ser um polimorfismo.

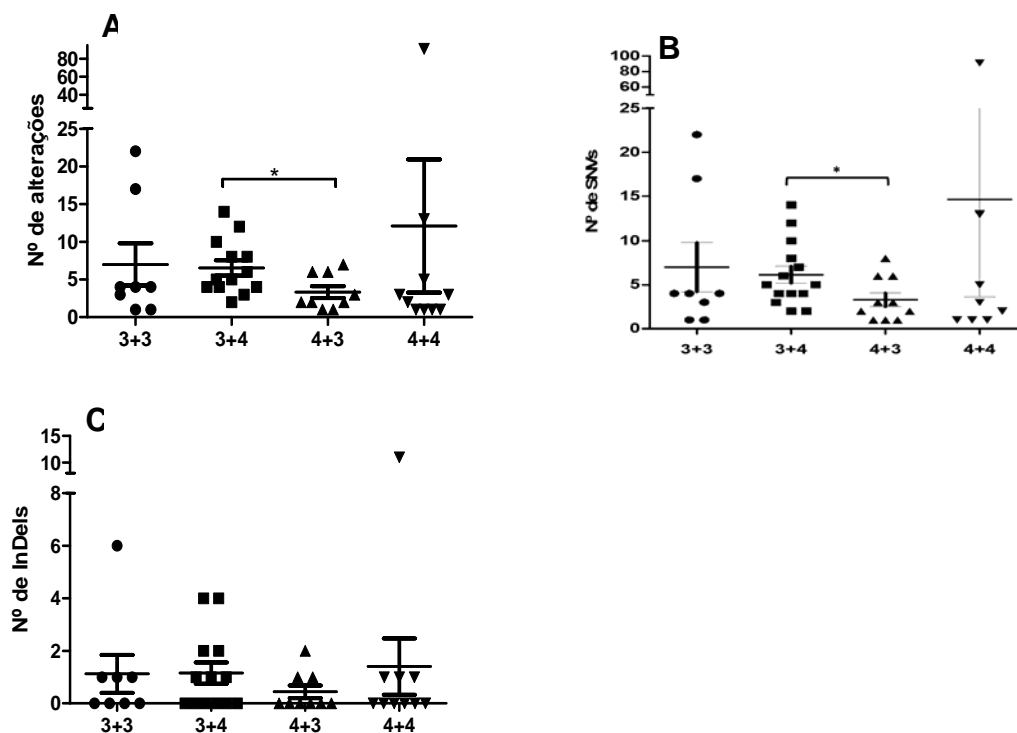
Em seguida, fomos avaliar o perfil de mutações somáticas em relação ao escore de Gleason. Não houve diferença significativa entre o número de alterações somáticas dos tumores classificados como escore de Gleason 3+4 (123 alterações) e 4+3 (152 alterações) considerando o total de variantes (p-valor = 0,1925) nem em relação ao número de alterações pontuais (SNVs) (p-valor = 0,2069) e pequenas inserções e deleções (InDels) (p-valor = 0,1215) (**Figura 12A, 12B e 12C**).



**Figura 12** - Distribuição e avaliação das amostras com relação ao Escore de Gleason da peça cirúrgica. **(A)** Distribuição do número total das alterações somáticas identificadas em cada grupo ( $p$ -valor = 0,1925). **(B)** Distribuição das variantes do tipo SNV, separadas por escore de Gleason ( $p$ -valor = 0,2069). **(C)** Distribuição das InDels identificadas, separadas por escore de Gleason ( $p$ -valor = 0,1215).

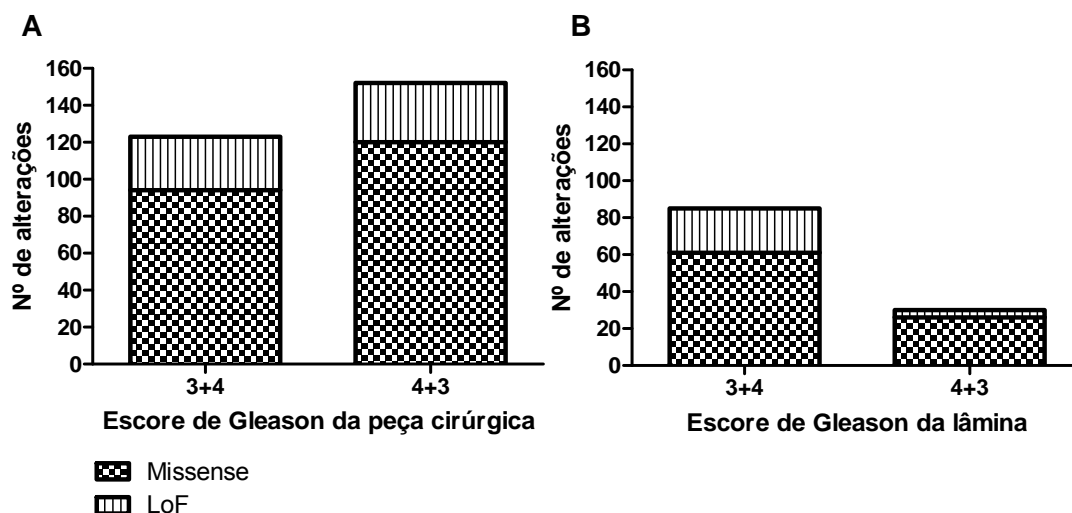
Apesar de os tumores terem sido classificados como 3+4 ou 4+3 com base na análise histopatológica da peça tumoral como um todo, nem sempre, foi possível representar estas duas lesões na amostra tumoral utilizada para o sequenciamento.

Assim, tomamos o cuidado de avaliar o grau de Gleason do fragmento de tumor que utilizamos para fazer a extração do DNA usado no sequenciamento, em colaboração com a Dr<sup>a</sup> Isabela Werneck da Cunha. Com isso, separamos as amostras em 4 grupos, aqueles que continham apenas lesões de grau 3, apenas lesões de grau 4, e aquelas com representação das duas lesões, dividimos nos grupos 3+4 e 4+3. A partir disso observamos uma diferença estatística em relação ao número total de alterações e entre o número total de SNVs entre as amostras classificadas com escore de Gleason 3+4 e 4+3 (p-valor= 0,0311 e p-valor=0,046, respectivamente), onde encontramos um número maior de alterações no grupo com escore 3+4 em relação ao 4+3 (**Figura 13 A e B**). No entanto, não identificamos significância estatística entre os grupos com relação o número de InDels entre estes (**Figura 13 C**).



**Figura 13** - Box plot representando a distribuição de alterações de acordo com o escore de Gleason da lâmina. Foi realizado teste estatístico T de Student para comparação entre todos os grupos dois-a-dois. **(A)** Análise com relação ao número total de alterações entre os grupos. **(B)** Análise com relação ao número de SNVs entre os grupos. **(C)** Análise com relação ao número de InDels entre os grupos. (\*) ( $p$ -valor < 0,05).

Além do teste *T Student*, utilizamos o teste Exato de *Fisher* para comparar o efeito das alterações (*missense* e *LoF*) entre os grupos de escore de Gleason 3+4 e 4+3 presentes na lâmina e na peça cirúrgica (**Figura 14A, 14B**). Porém, em nenhum dos casos houve significância estatística.



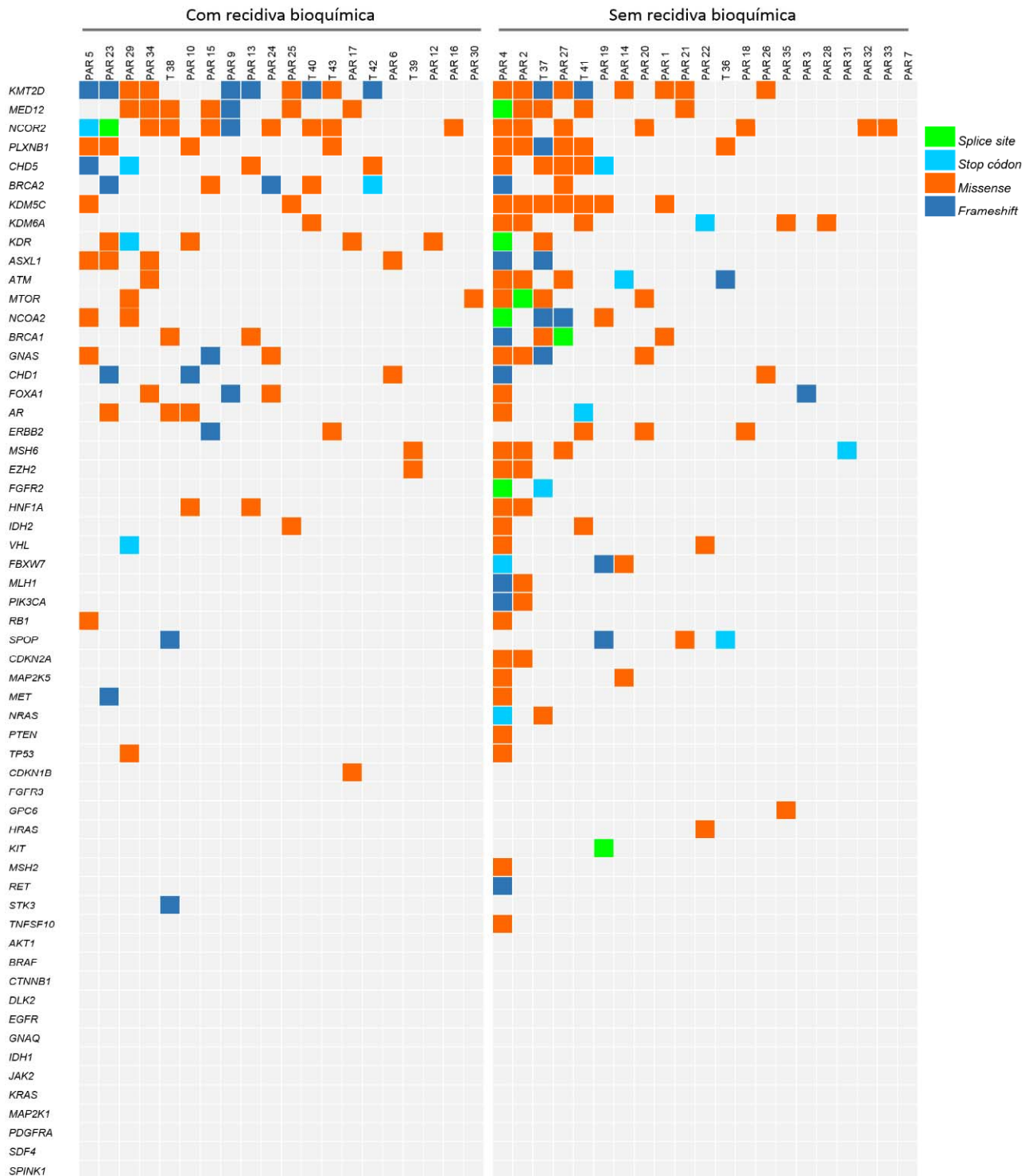
**Figura 14** - Gráfico de barras representando o resultado obtido através do Teste de Fisher. **(A)** Comparação entre os escores presentes na peça cirúrgica com relação ao efeito das variantes presentes neste grupo ( $p=0,6626$ ). **(B)** Comparação entre os escores presentes na lâmina ( $p=0,1020$ ).

Com relação ao número total de genes com alterações, dos 58 genes presentes no painel customizado, 45 apresentaram ao menos uma alteração somática (aproximadamente 78%), sendo 21 genes reportados em outros estudos como alterados em próstata e 24 genes presentes nos painéis comerciais. Trinta e cinco genes apresentaram mutações em mais de uma amostra, apesar de nenhuma destas alterações serem recorrentes (**Quadro 15**). Com isso, podemos observar que este tipo de tumor apresenta um perfil heterogêneo quanto aos genes encontrados alterados. A figura 15 mostra de forma geral as variantes encontradas distribuídas entre os genes e as amostras.

**Quadro 15** - Número de alterações por gene e número de amostras alteradas.

Gene	Nº de alterações	Nº de amostras alteradas
CDKN1B	1	1
FGFR3	1	1
GPC6	1	1
HRAS	1	1
KIT	1	1
MSH2	1	1
RET	1	1
STK3	1	1
TNFSF10	1	1
PTEN	2	1
CDKN2A	2	2
MAP2K5	2	2
MET	2	2
NRAS	2	2
TP53	2	2
MLH1	3	2
PIK3CA	3	2
RB1	3	2
FBXW7	3	3
SPOP	3	3
IDH2	4	3
VHL	4	3
HNF1A	4	4
FGFR2	5	2
EZH2	5	3
ERBB2	5	5
MSH6	5	5
AR	6	5
CHD1	7	5
FOXA1	7	5
BRCA1	8	6
GNAS	8	7
ATM	9	5
ASXL1	9	6
MTOR	9	6
NCOA2	9	6
BRCA2	11	7
KDM6A	11	7
KDR	11	7
KDM5C	11	9
CHD5	14	9
PLXNB1	15	10
MED12	20	12
NCOR2	20	17
KMT2D	39	19





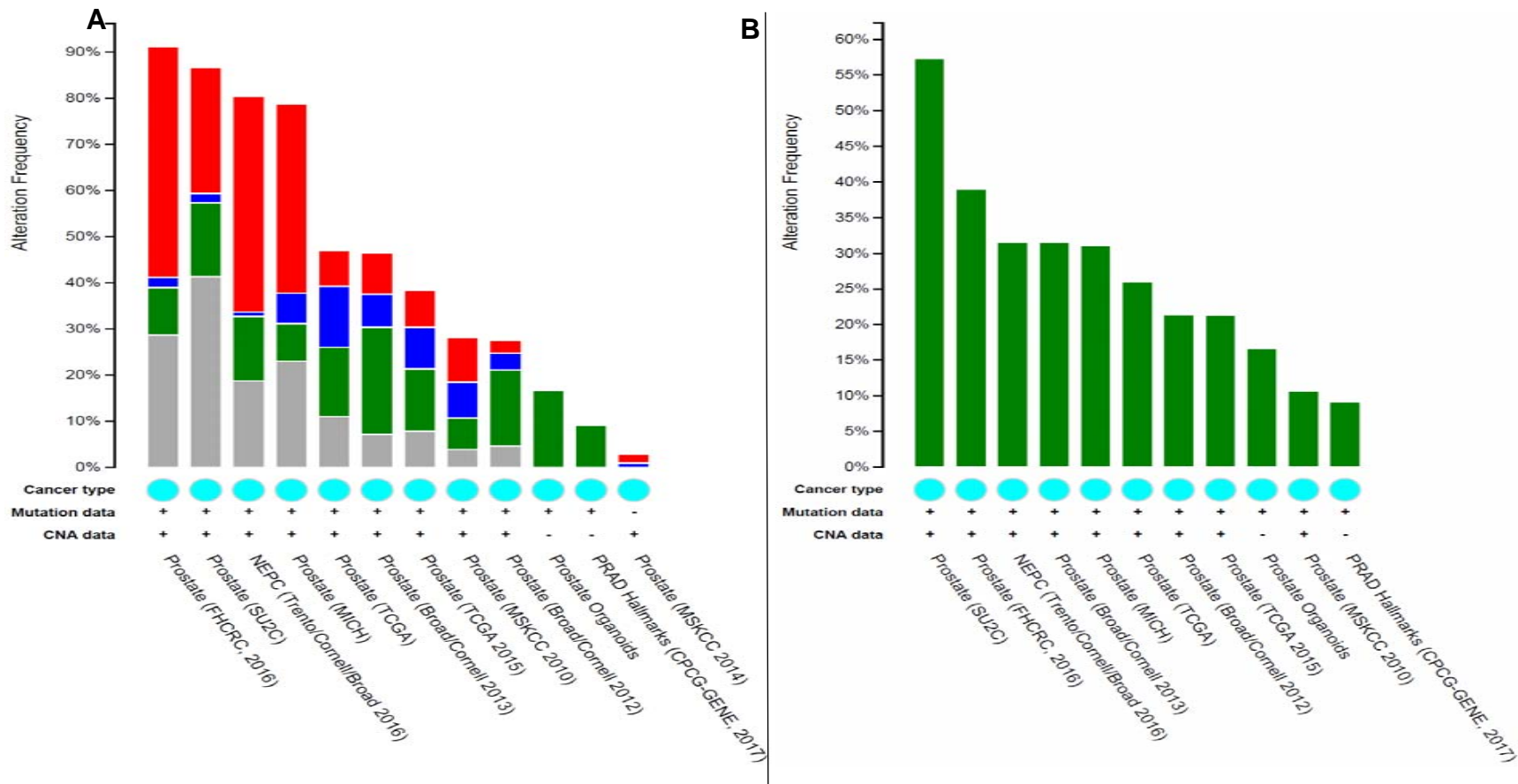
**Figura 15** - Overview das variantes identificadas entre as amostras com e sem recidiva bioquímica.

Com o intuito de explorar os genes com maior número de mutações, realizamos também análises de ontologia e enriquecimento de vias (*Gene Ontology*, KEGG e *Reactome*) através do site *Webgestalt* (seção 3.4.3. de Materiais e Métodos) para investigar quais vias estariam sendo afetadas por estes genes. A primeira análise, realizada com os genes alterados em pelo menos 10% das amostras (21 genes – *KMT2D*, *MED12*, *NCOR2*, *PLXNB1*, *CHD5*, *BRCA2*, *KDM5C*, *KDM6A*, *KDR*, *ASXL1*, *ATM*, *MTOR*, *NCOA2*, *BRCA1*, *GNAS*, *CHD1*, *FOXA1*, *AR*, *ERBB2*, *MSH6* e *HNF1A*) e utilizando os 58 genes do painel como referência, obtivemos um enriquecimento de três categorias relacionadas com o remodelamento de cromatina (**Quadro 16**). Com este mesmo *subset* de genes, realizamos uma análise de enriquecimento de vias. As análises feitas utilizando os dados do KEGG não mostraram nenhuma via com significância estatística, porém quando utilizamos os dados do *Reactome*, duas vias, também relacionadas com modificação/remodelamento/organização de cromatina, mostraram-se significativas.

**Quadro 16** - Análise de enriquecimento de categorias utilizando os dados de ontologia (*Gene Ontology*). Na tabela, listamos as três categorias que apresentaram p valor estatisticamente significativo (p Valor <0,005)

ID	Categoria	Número de genes	Genes	pValue
GO:0043933	<i>macromolecular complex subunit organization</i>	14	<i>NCOA2; CHD1; ASXL1; MTOR; CHD5; FOXA1; AR; ATM; BRCA1; BRCA2; HNF1A; KDM6A; KMT2D; KDM5C</i>	0.00191
GO:0016569	<i>covalent chromatin modification</i>	11	<i>NCOA2; CHD1; ASXL1; CHD5; FOXA1; ATM; BRCA1; BRCA2; KDM6A; KMT2D; KDM5C</i>	0.00219
GO:0006325	<i>chromatin organization</i>	11	<i>NCOA2; CHD1; ASXL1; CHD5; FOXA1; ATM; BRCA1; BRCA2; KDM6A; KMT2D; KDM5C</i>	0.00487

Para investigar se estes genes foram encontrados na literatura, realizamos uma análise comparativa utilizando o CBio Portal (<http://www.cbioportal.org>) o qual trata-se de uma ferramenta que disponibiliza dados presentes na literatura, incluindo dados do TCGA. Primeiramente comparamos os 21 genes alterados em mais de 10% das amostras com os dados de 12 estudos disponíveis no portal com CaP. Na figura 15, podemos observar a representatividade dos nossos dados em outros estudos com CaP tanto com relação a múltiplas alterações (**Figura 16A**) como também apenas alterações do tipo mutação (**Figura 16B**).



**Figura 16** - Distribuição dos genes alterados em mais de 10% das amostras nos dados disponíveis de 12 estudos de CaP no CBio Portal. **(A)** Distribuição de acordo com dados de mutação (verde), deleção (azul), amplificação (vermelho) e múltiplas alterações (cinza), onde a % de alteração é o número de casos dos estudos (eixo x) que apresentam alterações nos 21 genes do nosso set. **(B)** Distribuição apenas de acordo com os dados de mutação (verde).

Após essa análise geral, selecionamos o estudo de FRASER et al. (2017), por ser um estudo que também avaliou apenas tumores de próstata com escore de Gleason intermediário, e realizamos uma análise comparativa entre os dados publicados por eles e os nossos. Os 45 genes alterados no nosso estudo apresentaram mutação em 107 (24%) casos do estudo de Frase et al, 2017 (**Tabela 2**), e os 21 genes mais frequentemente alterados na nossa casuística foram encontrados alterados em 9% dos casos do estudo (41 de 449). Os genes com maior número de casos alterados no estudo foram *SPOP* (8%), *TP53* (4%), *FOXA1* (2,4%) e *MED12* (2,4%).

**Tabela 2** - Genes alterados em nosso estudo com a porcentagem de alteração em nossa casuística e na casuística do estudo de FRASER et al. (2017).

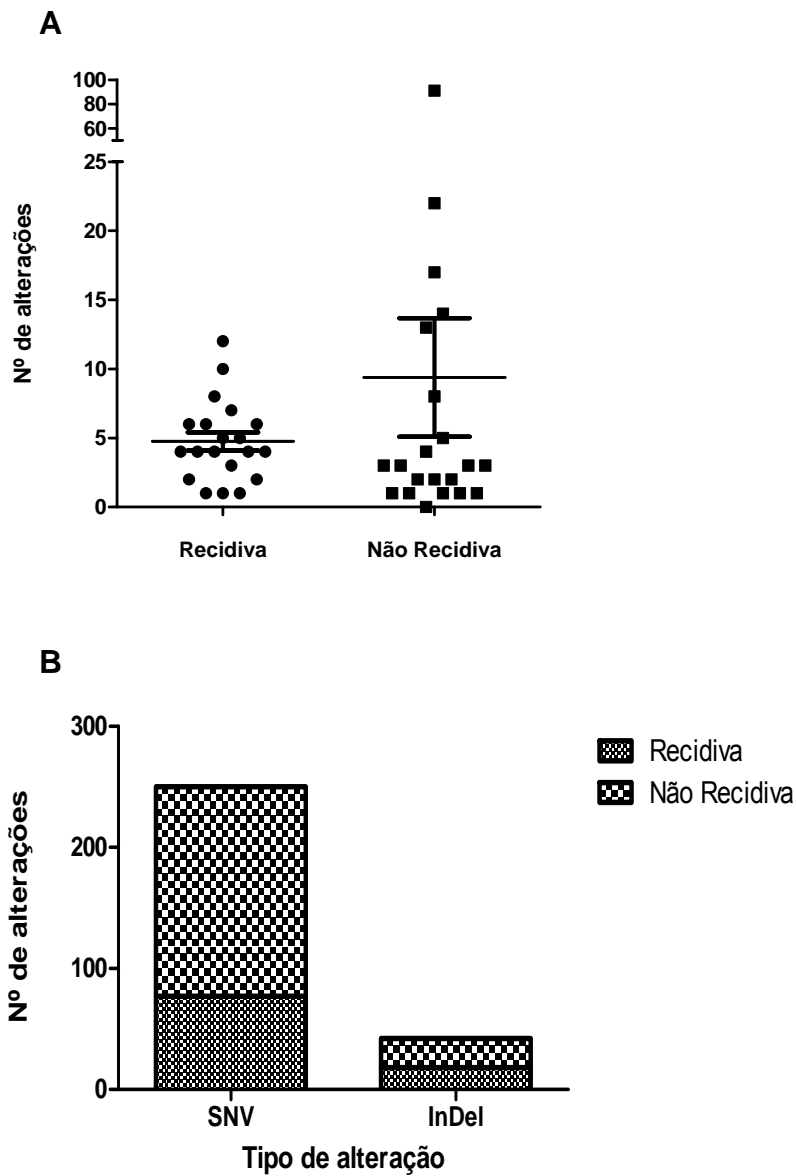
Gene	Porcentagem no nosso estudo	Porcentagem no estudo de Fraser
KMT2D	13,4	0,2
MED12	6,8	2,4
NCOR2	6,8	0,2
PLXNB1	5,1	0
CHD5	4,8	0,2
BRCA2	3,8	0,4
KDM5C	3,8	0
KDM6A	3,8	0,2
KDR	3,8	0,2
ASXL1	3,1	0
ATM	3,1	1,8
MTOR	3,1	0
NCOA2	3,1	0,2
BRCA1	2,7	0,4
GNAS	2,7	0,2
CHD1	2,4	0,7
FOXA1	2,4	2,4
AR	2,1	0,4
ERBB2	1,7	0,2
EZH2	1,7	0
FGFR2	1,7	0,2
MSH6	1,7	0,2
HNF1A	1,4	0
IDH2	1,4	0
VHL	1,4	0
FBXW7	1	0,2
MLH1	1	0
PIK3CA	1	1,1
RB1	1	0,2
SPOP	1	8
CDKN2A	0,7	0,2
MAP2K5	0,7	0
MET	0,7	0,2
NRAS	0,7	0
PTEN	0,7	1,1
TP53	0,7	4
CDKN1B	0,3	0,2
FGFR3	0,3	0,2
GPC6	0,3	0
HRAS	0,3	0,2
KIT	0,3	0,2
MSH2	0,3	0
RET	0,3	0
STK3	0,3	0
TNFSF10	0,3	0

Além disso, o Cbio Portal também permite uma análise de co-ocorrência de mutações, e a partir desta análise de exclusividade mútua, ou seja, probabilidade dos genes da lista terem mutações mutuamente exclusivas ou com tendência a co-ocorrência, verificamos uma associação com significância estatística entre os genes *NCOA2* e *FOXA1* (p valor = 0,023) no estudo publicado. Na nossa casuística também identificamos uma amostra (Par 04) com co-ocorrência de mutação entre esses dois genes.

#### **4.4.4 Perfil mutacional de tumores de próstata associado com recidiva bioquímica**

No total, avaliamos 20 casos sem recidiva e 21 casos com recidiva bioquímica. O grupo de tumores com recidiva bioquímica apresentou um total de 95 alterações, das quais 77 foram classificadas como SNV e 18 InDel, e 197 alterações foram anotados no grupo sem recidiva, com 173 classificadas como SNV e 24 InDel. Com relação a função, no grupo com recidiva, 71 foram classificadas como mutações *missense* e 24 como perda de função (LoF), e no grupo sem recidiva 156 *missense* e 41 LoF.

Apesar de o grupo sem recidiva apresentar um número total de variantes maior, não houve diferença estatística quando comparados o número de variantes somáticas de cada tumor (**Figura 17A**), e nem em relação ao tipo de alteração (**Figura 17B**).



**Figura 17** - Análise comparativa entre os grupos com e sem recidiva. **(A)** Distribuição do número de alterações identificadas em cada grupo (Teste *T-Student* –  $p=0,3039$ ). **(B)** Comparação entre os grupos com e sem recidiva de acordo com a classificação das alterações em SNVs e InDels (Teste Exato de *Fisher* –  $p=0,1539$ ).



Identificamos 29 genes mutados no grupo de amostras com recidiva e 43 genes mutados no grupo de amostras sem recidiva, no entanto, não observamos nenhum gene preferencialmente mutado em um grupo ou no outro (**Quadro 18**). Realizamos análises de enriquecimento de via e ontologia, para o grupo de genes mutados em 20% das amostras de cada grupo. Para o grupo com recidiva (8 genes – *KMT2D*, *MED12*, *NCOR2*, *PLXNB1*, *CHD5*, *BRCA2*, *KDR* e *ASXL1*), não encontramos nenhuma via (KEGG e Reactome) ou categoria (GO) com p valor significativo, porém, para o grupo sem recidiva (13 genes – *KMT2D*, *MED12*, *NCOR2*, *PLXNB1*, *CHD5*, *KDM5C*, *KDM6A*, *ATM*, *MTOR*, *NCOA2*, *BRCA1*, *GNAS* e *MSH6*), encontramos duas categorias com p-valor <0,005, a de modificação e organização de cromatina (**Quadro 17**).

**Quadro 17** - Categorias enriquecidas no grupo sem recidiva bioquímica.

ID	Via	pValor
R-HSA-3247509	<i>Chromatin modifyng enzymes</i>	4.9e-03
R-HSA-4839726	<i>Chromatin organizations</i>	4.9e-03

**Quadro 18** - Número de alterações por gene separados por grupos com e sem recidiva.

Gene	Nº de alterações no grupo com recidiva	Nº de alterações no grupo sem recidiva
AR	4	2
ASXL1	4	5
ATM	1	8
BRCA1	2	6
BRCA2	6	5
CDKN1B	1	0
CDKN2A	0	2
CHD1	4	3
CHD5	5	9
ERBB2	2	3
EZH2	1	4
FBXW7	0	3
FGFR2	0	5
FGFR3	0	1
FOXA1	3	4
GNAS	4	4
GPC6	0	1
HNF1A	2	2
HRAS	0	1
IDH2	1	3
KDM5C	2	9
KDM6A	1	10
KDR	5	6
KIT	0	1
KMT2D	15	24
MAP2K5	0	2
MED12	7	13
MET	1	1
MLH1	0	3
MSH2	0	1
MSH6	1	4
MTOR	2	7
NCOA2	2	7
NCOR2	10	10
NRAS	0	2
PIK3CA	0	3
PLXNB1	5	10
PTEN	0	2
RB1	1	2
RET	0	1
SPOP	0	3
STK3	1	0
TNFSF10	0	1
TP53	1	1
VHL	1	3

## 6 DISCUSSÃO

No presente trabalho realizamos o sequenciamento de amostras de CaP com e sem recidiva bioquímica e escore de Gleason 7 e 8 na plataforma *Illumina*, utilizando o *kit* de sequenciamento *Mid Output* de 300 ciclos. De acordo com os parâmetros disponibilizados pela empresa, conseguimos atingir de forma satisfatória os resultados gerais do sequenciamento gerando mais de 260.000.000 de sequências e 35,4G de dados. Ficamos um pouco abaixo apenas na porcentagem de sequências com qualidade Q30, a qual o fabricante usa como parâmetro uma medida de 75% de sequências com este critério de qualidade, e nós geramos 72,2%. No entanto, por essa diferença ser pequena, acreditamos que este fato não comprometeu a qualidade dos nossos dados, além do mais, o critério de qualidade Q30 é bem restritivo, e alguns autores já relatam que, devido à qualidade dos dados gerados pela plataforma *Illumina*, o critério de qualidade Q20 poderia ser utilizado (PATEL e JAIN 2012).

Após o sequenciamento das amostras, analisamos de forma individualizada os parâmetros gerais da corrida, e a partir da identificação da porcentagem dos índices utilizados por amostra, observamos que duas destas tiveram problemas de representatividade. O componente normal do par 08 (sem recidiva), ou seja, a amostra SG08, foi pouco representada e teve poucas leituras identificadas, já o componente tumoral do par 11 (com recidiva), a T11, foi super-representada gerando leituras acima do esperado.

Apesar de termos quantificado todas as amostras por qPCR, seguindo as recomendações do protocolo do fabricante, juntar de forma equilibrada uma grande quantidade de amostras em quantidades equimolares em um único *pool* é uma tarefa desafiadora, onde diversas diluições diferentes são realizadas para cada amostra, podendo, portanto, levar a pequenos desbalanços de representatividade. Para não comprometermos as análises seguintes, decidimos excluir esses dois pares. Apesar disso, tivemos uma boa amostragem de ambos os grupos de interesse com 20 e 21 amostras, com e sem RB, respectivamente.

Com relação às metodologias utilizadas para analisar os dados gerados pelo sequenciamento (alinhamento das sequências e chamada de variantes somáticas), usamos duas linhas de análise distintas. Uma delas foi a utilização de um aplicativo disponibilizado pela empresa *Illumina*, em seu próprio espaço virtual (*Basespace*), chamado *TruSeq Amplicon* de acordo com o documento *TruSeq Amplicon App User Guide 15055857 B*. Este aplicativo foi desenvolvido para análise de painéis de amplicon customizados (utilizado neste trabalho – *TruSeq Custom Amplicon*) e painéis previamente desenhados e comercializados pela empresa *Illumina* (*TruSeq Amplicon Cancer Panel* e *TruSight Myeloid Sequencing Panel*). Apesar desta ferramenta facilitar as análises e integrar os dados de forma mais fácil, determinados parâmetros importantes de alinhamento e chamada de variantes, não podem ser editados e informações importantes sobre o *pipeline* de análise não encontram-se documentadas. Dentre as opções de alinhadores disponíveis no aplicativo, selecionamos o *Smith-Waterman*, o

qual trata-se de um algoritmo de alinhamento local base-a-base que compara segmentos de vários comprimentos e otimiza a medida de similaridade entre as sequências (SMITH e WATERMAN 1981), e para a chamada de variantes somáticas utilizamos um algoritmo *Somatic*, desenvolvido pela *Illumina*. A outra linha de análise realizamos com a equipe de bioinformática, onde utilizamos como alinhador o algoritmo *BWA*, o qual realiza também um alinhamento local (LI e DURBIN 2009), e para fazer a chamada de variantes somáticas, utilizamos a ferramenta *MuTect*. Esta é uma ferramenta desenvolvida pelo *Broad Institute*, o qual aplica um classificador bayesiano para detectar mutações somáticas em baixas frequências e filtros que garantem a especificidade das variantes chamadas (CIBULSKIS et al. 2013).

Como forma de avaliar as duas linhas de análise, primeiramente comparamos os resultados dos alinhadores de acordo com a porcentagem de sequências não mapeadas por eles e a qualidade do alinhamento a partir do visualizador IGV. Observamos que o alinhador *BWA* teve um melhor desempenho quando comparado com o *Smith-Waterman*, com apenas 3% de sequências não mapeadas e uma melhor qualidade de alinhamento das posições identificadas como sendo mutações somáticas pelas ferramentas (*Somatic* e *MuTect*) de forma exclusiva (Figura 10). Além disto, este alinhador foi utilizado em grande parte dos estudos da literatura (BACA et al. 2013; XU et al. 2013; CRONA et al. 2015; MANSON-BAHR et al. 2015; SOWALSKY et al. 2017; FRASER et al. 2017).

Com relação à chamada de variantes, decidir qual ferramenta utilizar é uma etapa crítica. Para que a identificação seja realizada de forma sensível e específica, é preciso que a ferramenta em questão apresente um equilíbrio entre detectar mutações somáticas verdadeiras e de baixa frequência com restringência de critérios para reduzir o número de falsos-positivos. KRØIGÅRD et al. (2016) publicaram um artigo de comparação entre 9 ferramentas distintas de identificação de variantes somáticas (*EBCall*, *Mutect*, *Seurat*, *Shimmer*, *Indelocator*, *Somatic Sniper*, *Strelka*, *VarScan 2* e *Virmid*) e observaram que, utilizando os mesmos dados de sequenciamento, houve uma grande variação no número de variantes identificadas entre os diferentes chamadores. Além disso, foi também observada uma menor concordância na chamada de InDel quando comparado com a chamada de SNV. De forma geral, este estudo concluiu que os chamadores *EBCall*, *MuTec*, *Virmid* e *Strelka*, apresentaram um maior número de posições chamadas em comum, e que estes seriam as ferramentas de identificação de variantes somáticas mais confiáveis para dados de média e alta cobertura (KRØIGÅRD et al. 2016). Partindo disso e de acordo com os nossos resultados encontrados, decidimos optar pela utilização da ferramenta *MuTect*.

Utilizando esta ferramenta identificamos alterações somáticas nos tumores de próstata de score de Gleason intermediário. Em média encontramos 7 mutações somáticas por tumor, variando de 0 a 91 alterações. Este baixo número de alterações somáticas por tumor está de acordo com dados da literatura que reportam que o CaP de forma geral,

apresenta um valor inferior com relação à taxa de mutação quando comparado com outros tipos tumorais (ABESHOUSE et al. 2015). Tumores de próstata, analisados por diferentes metodologias de sequenciamento, vêm sendo descritos por apresentarem cargas mutacionais globais baixas quando comparados com outros tumores. KAN et al. (2010) realizaram um estudo para identificar padrões de mutações somáticas em diferentes tipos de câncer, e observaram que dentre os tumores analisados, adenocarcinoma e carcinoma escamoso de pulmão apresentaram as maiores taxas mutacionais (3,5 e 3,9 mutações/Mb, respectivamente), enquanto tumores de próstata apenas 0,33 mutações/Mb. Esta baixa taxa mutacional também foi reportada por outros estudos, variando entre 0,31 a 0,94 mutações/Mb (TAYLOR et al. 2010; BERGER et al. 2011; ABESHOUSE et al. 2015; FRASER et al. 2017). Esta disparidade também foi vista por VOGELSTEIN et al. (2013), quando compilaram dados de sequenciamento de genoma completo de diferentes tipos de câncer, e mostraram que tumores de próstata apresentaram uma mediana de 41 mutações/tumor, enquanto tumores de pulmão apresentaram uma mediana de 310 mutações/tumor.

Em contrapartida, outros tipos de alterações têm sido relatados de forma recorrente em tumores de próstata e vem sendo associados com a probabilidade de recorrência da doença como alterações no número de cópias, rearranjos gênicos e alterações no padrão de metilação do DNA (KAN et al. 2010; TAYLOR et al. 2010; HIERONYMUS et al. 2014; FRASER et al. 2017). Dentre essas alterações, pode-se citar ganhos dos

cromossomos 7 e 8q, bem como a perda em heterozigose de 8p, 13q, 16q e 18, ampliações recorrentes em oncogenes como *CCND1*, *MYC*, *FGFR1* e *WHSC1L1*, deleções recorrentes no gene *PTEN*, fusão entre os genes *TMPRSS2* e *ERG* e também deleções em *TP53* (17p13.1), *CDKN1B* (12p13.1), *MAP3K1* (5q11.2), *FANCD2* (3p26), *MAP3K7* (6q.12-22) e *CHD1* (5q15-q21) (ABESHOUSE et al. 2015). Com relação ao status de metilação do CaP, FRASER et al. (2017) encontraram forte associação com recidiva bioquímica da doença, onde de nove eventos de recidiva avaliados, seis envolviam alterações no padrão de metilação do DNA. No nosso estudo, avaliamos apenas a ocorrência de mutações pontuais e pequenas inserções e deleções no DNA. Se outros eventos estão ou não presentes e se podem ser associados às características clinico-patológicas das amostras poderiam ser investigados em estudos futuros.

No mais, observamos no nosso estudo uma heterogeneidade no número de variantes. Um dos tumores analisados, o tumor 07, não apresentou nenhuma variante somática conforme os nossos critérios, diferentemente do tumor 04, o qual apresentou um número muito elevado de alterações, totalizando 91 variantes. Heterogeneidade em tumores de próstata já vem sendo observada em diferentes aspectos, tanto clínicos e histológicos, onde tumores com mesma classificação histológica apresentam evoluções diferentes da doença (TAYLOR et al. 2010). Vinte e seis por cento dos tumores estudados por ABESHOUSE et al. (2015) não puderam ser caracterizados em um perfil de alterações específico pois estes apresentavam alterações guiadas por eventos ainda desconhecidos ou por



mais de um evento molecular, mostrando a diversidade desses tumores com relação às alterações no número de cópias, expressão gênica e perfil de metilação do DNA. Além do mais, esta diversidade também foi identificada com relação ao número de SNVs, através de sequenciamento de genoma completo de tumores de próstata localizados, sugerindo que o perfil heterogêneo deste tumor torna o tratamento personalizado e a busca de marcadores um grande desafio (BARBIERI et al. 2012; LALONDE et al. 2014; BOUTROS et al. 2015).

Em relação ao tumor 07 não podemos descartar a hipótese de alterações em genes não investigados neste estudo estarem presentes neste tumor, bem como rearranjos gênicos, alteração no número de cópias e alterações no padrão de metilação.

No outro extremo, o tumor 04 apresenta um perfil sugestivo de tumor hipermutado. Este perfil de hipermutação vêm sendo descrito tanto em tumores metastáticos quanto em tumores localizados de próstata (KUMAR et al. 2011; PRITCHARD et al. 2014; ROBINSON et al. 2015; KUMAR et al. 2016), e um dos mecanismos que vêm sendo correlacionado com este evento, são alterações em genes envolvidos com mecanismo de reparo do DNA, como *MSH2* e *MSH6* (PRITCHARD et al. 2014). No tumor 04, duas alterações somáticas foram reportadas, uma no gene *MSH2* (c.1847C>A) e outra no *MSH6* (c.3389T>C). Além disso, encontramos alterações somáticas no gene *MSH6* em outros tumores com um número de alterações acima da média (média de 7 alterações/tumor), T27 e T02, os quais possuem 14 e 17 alterações, respectivamente. Apesar de ser um achado interessante, não

podemos afirmar que a presença destas alterações esteja associada com perfil hipermutado nestes tumores, visto que não há descrições dessas variantes em banco de dados caracterizando-as como patogênicas, sendo consideradas alterações de significado clínico incerto.

Tumores classificados com escore de Gleason 7 têm sido identificados na literatura por apresentarem comportamentos distintos quanto ao prognóstico e progressão da doença (LAU et al. 2001; RASIAH et al. 2003; BURDICK et al. 2009). LAU et al. (2001) avaliaram prognóstico e recidiva da doença de acordo com o grau primário apresentado pelo tumor, ou seja, tumores 3+4 (grau primário 3) e 4+3 (grau primário 4). Com os resultados obtidos, eles identificaram que tumores classificados como 4+3 apresentam comportamento mais agressivos que os tumores 3+4. Porém, apesar do grau primário estar associado à progressão dos tumores, ele não fornece informações quanto ao prognóstico de forma mais precisa quando comparado com outros fatores como: PSA, acometimento linfonodal e de vesículas seminais, comprometimento das margens cirúrgicas e estadiamento do tumor (LAU et al. 2001). BURDICK et al. (2009) realizaram uma análise multivariada e também identificaram que tumores com padrão de Gleason primário 4 possuem característica mais agressiva que tumores com padrão de Gleason primário 3. Adicionalmente, eles encontraram relação significativa entre padrão primário 4 com maiores taxas de recidiva bioquímica (BURDICK et al. 2009). No nosso estudo não encontramos diferenças significativas entre casos classificados com escore de Gleason 3+4 e 4+3 com relação ao número total de alterações, SNVs ou InDels

(Figura 12). Embora não tenhamos identificado diferença com relação ao escore de Gleason da peça cirúrgica, quando realizamos as análises utilizando o escore de Gleason presente na lâmina referente à porção do tumor que utilizamos no sequenciamento, observamos uma diferença estatisticamente significativa entre os escores 3+4 e 4+3 (Figura 13), onde tumores com grau primário 3 apresentaram maior número de alterações do que tumores com grau primário 4.

O painel desenvolvido para realizar este estudo mostrou ser direcionado, visto que, dos 58 genes presentes no mesmo, 45 apresentaram ao menos uma alteração somática e 35 foram representados em mais de uma amostra (Quadro 11).

O gene que encontramos com o maior número de alterações (39) foi o gene *KMT2D*, também conhecido como *MLL2*, o qual está envolvido com modificações na histona H3K4, conhecida por ser um componente importante na regulação da cromatina (BARBIERI et. al 2012). GRASSO et al. (2012) avaliaram a relação deste gene com o receptor de andrógeno (*AR*), e observaram que a proteína codificada pelo gene *KMT2D* interage com o *AR* de forma a mediar a sinalização deste gene. Este evento foi identificado em amostras de tumores metastáticos, e observamos que este gene encontra-se alterado também em tumores primários. Apesar de ser encontrado alterado em maior frequência em amostras metastáticas, ABESHUSE et al. (2015) também encontraram o gene em questão alterado em tumores primários. Alterações em genes que codificam proteínas que interagem com o gene *AR* podem desregular esta via de

sinalização ocasionando alterações no perfil destes tumores (BARBIERI et al. 2012; GRASSO et al. 2012; LINDBERG et al. 2013).

Outros genes que codificam proteínas que medeiam a sinalização na via do *AR* também foram encontrados em nosso estudo com número elevado de alterações. Dentre estes podemos citar genes com função de co-ativação transcricional (*NCOA2*, *NCOR2*), genes que atuam na regulação da cromatina (*CHD1*, *KDM6A*, *KMT2D*) e fatores de transcrição (*FOXA1*, *MED12*), corroborando com dados da literatura, os quais relatam alterações nestes genes tanto em tumores metastáticos quanto em tumores primários (BARBIERI et al. 2012; GRASSO et al. 2012; LINDBERG et al. 2013). Além disso, também encontramos alterações no próprio gene *AR* (6 alterações), que podem afetar a função deste receptor. Tumores primários de próstata exibem uma atividade do receptor de andrógeno variável (ABESHOUSE et al. 2015). Alterações no gene *AR* vêm sendo reportadas em tumores de próstata metastáticos e com menor frequência ou até mesmo ausentes em tumores primários localizados (TAYLOR et al. 2010; BARBIERI et al. 2012; GRASSO et al. 2012).

Neste estudo encontramos vinte e um genes mutados em pelo menos 10% das amostras (*KMT2D*, *MED12*, *NCOR2*, *PLXNB1*, *CHD5*, *BRCA2*, *KDM5C*, *KDM6A*, *KDR*, *ASXL1*, *ATM*, *MTOR*, *NCOA2*, *BRCA1*, *GNAS*, *CHD1*, *FOXA1*, *AR*, *ERBB2*, *MSH6* e *HNF1A*), os quais foram agrupados de forma significativa (p-valor <0,005) nas análises de ontologia e de vias, utilizando o banco de dados do *Reactome*, como genes relacionados a modificação, remodelamento e organização de cromatina. Além disso,

quando realizamos esta mesma análise com os genes mutados em 20% das amostras de cada grupo com e sem recidiva, observamos que o grupo sem recidiva encontramos significância estatística para o enriquecimento de duas categorias também relacionadas com modificação e organização de cromatina. O fato de em nossos dados termos identificado a via de organização e remodelamento de cromatina enriquecida não é um achado isolado, outros trabalhos publicados relataram este fato em CaP (BERGER et al. 2011; BARBIERI et al. 2012; GRASSO et al. 2012; BACA et al. 2013; BARBIERI et al. 2013; FRASER et al. 2017).

O remodelamento da cromatina é um evento chave quando falamos em regulação da expressão gênica, apoptose, replicação e reparo do DNA e segregação e condensação cromossômica. Alterações neste processo estão associadas com o desenvolvimento de doenças, sendo uma delas o câncer (GOLDBERG et al. 2007). Várias vias vêm sendo relatadas por atuarem neste processo de remodelamento da cromatina, como modificações relacionadas às histonas (WANG et al. 2007a) e remodelamento dependente de ATP (WANG et al. 2007b). Modificações das histonas, como metilação, perda de acetilação, vêm sendo observadas em vários tumores primários (FRAGA et al. 2005). Além disso, diferentes padrões de alterações em modificação de histonas têm sido correlacionados com o risco de recorrência do CaP (SELIGSON et al. 2005). Alterações genômicas, como mutação e deleção, que envolvem genes codificadores de proteínas envolvidas na maquinaria dessas modificações têm sido implicadas na oncogênese tanto

por promoverem o crescimento do tumor quanto por suprimirem a atividade de genes supressores tumorais (WANG et al. 2007a).

Em nosso set de análise, não encontramos alterações recorrentes e nem genes que se destacassem como forma de categorizar os tumores, como por exemplo, em tumores que recidivaram de tumores que não recidivaram. Acreditamos que este fato ocorreu devido à nossa casuística ser pequena e a heterogeneidade tumoral descrita na literatura. Um estudo recente, avaliou 130 pacientes com tumores de próstata localizados de escore de Gleason intermediário com dados de recidiva, e identificou apenas uma SNV no gene *ATM* associada a todos os casos que recidivaram, sendo assim categorizada como preditora de recidiva (FRASER et al. 2017). Além disso, neste mesmo estudo, FRASER et al. (2017) observaram que o status de metilação do DNA, estava muito mais associado com a recorrência da doença do que qualquer outro tipo de alteração genômica. Sendo assim, talvez por não termos realizado nenhuma análise do perfil de metilação das amostras, não encontramos nenhuma associação estatisticamente significativa que destacassem os grupos com e sem recidiva bioquímica da doença.

Tratando-se de uma doença com características heterogêneas, como discutido anteriormente, painéis gênicos mostram-se importantes ferramentas para um melhor entendimento da biologia do tumor em questão e para identificação de perfis que possam melhor segregar os pacientes quanto ao desenvolvimento da doença (BARBIERI et al. 2012; ABESHOUSE et al. 2015). Além disso, metodologias como estas, são importantes com

relação ao tratamento e acompanhamento do paciente, quando pensamos em medicina personalizada (BOUTROS et al. 2015), e também com o desenvolvimento de novas terapias alvos (BELTRAN et al. 2013).

## 7 CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos a partir do desenvolvimento deste trabalho, podemos concluir:

- Foram identificadas no total 292 mutações somáticas, com uma média de 7 mutações somáticas por tumor (intervalo de 0 e 91 mutações).
- Aproximadamente 78% dos genes presentes no painel customizado apresentou pelo menos uma alteração somática. Dentre os principais genes mutados, destacam-se aqueles envolvidos com a via de organização e remodelamento de cromatina.
- Não foram encontradas diferenças no perfil de mutações somáticas entre o grupo de tumores com e sem recidiva bioquímica. A via de remodelamento de cromatina foi encontrada como significativamente afetada por mutações no grupo de tumores sem recidiva bioquímica.
- Devido à grande heterogeneidade tumoral e pequeno número de amostras, não foram encontradas associações entre mutações somáticas e características clinico-patológicas.



## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abeshouse A, Ahn J, Akbani R, et al. The molecular taxonomy of primary prostate cancer. **Cell** 2015; 163:1011-25.

Aihara M, Wheeler TM, Ohori M, Scardino PT. Heterogeneity of prostate cancer in radical prostatectomy specimens. **Urology** 1994; 43:60-6.

Al Olama AA, Kote-Jarai Z, Berndt SI, et al. A meta-analysis of 87,040 individuals identifies 23 new susceptibility loci for prostate cancer. **Nat Genet** 2014; 46:1103-9.

Ash D, Flynn A, Battermann J, De Reijke T, Lavagnini P, Blank L. ESTRO/EAU/EORTC recommendations on permanent seed implantation for localized prostate cancer. **Radiother Oncol** 2000; 57:315-321.

Baca SC, Prandi D, Lawrence MS, et al. Punctuated evolution of prostate cancer genomes. **Cell** 2013; 153:666-77.

Barbieri CE, Baca SC, Lawrence MS, et al. Exome sequencing identifies recurrent SPOP, FOXA1 and MED12 mutations in prostate cancer. **Nat Genet** 2012; 44:685-9.

Barbieri CE, Bangma CH, Bjartell A, et al. The mutational landscape of prostate cancer. **Eur Urol** 2013; 64:567-76.

Beltran H, Yelensky R, Frampton GM, et al. Targeted next-generation sequencing of advanced prostate cancer identifies potential therapeutic targets and disease heterogeneity. **Eur Urol** 2013; 63:920-6.

Benson MC, Whang IS, Pantuck A, et al. Prostate specific antigen density: a means of distinguishing benign prostatic hypertrophy and prostate cancer. **J Urol** 1992; 147:815-6.

Berger MF, Lawrence MS, Demichelis F, et al. The genomic complexity of primary human prostate cancer. **Nature** 2011; 470:214-20.

Bianco-Miotto T, Chiam K, Buchanan G, et al. Global levels of specific histone modifications and an epigenetic gene signature predict prostate cancer progression and development. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2010; 19:2611-22.

Bickers B, Aukim-Hastie C. New molecular biomarkers for the prognosis and management of prostate cancer--the post PSA era. **Anticancer Res** 2009; 29:3289-98.

Boutros PC, Fraser M, Harding NJ, et al. Spatial genomic heterogeneity within localized, multifocal prostate cancer. **Nat Genet** 2015; 47:1-14.

Bubendorf L, Schöpfer A, Wagner U, et al. Metastatic patterns of prostate cancer: an autopsy study of 1,589 patients. **Hum Pathol** 2000; 31:578-83.

Burdick MJ, Reddy CA, Ulchaker J, et al. Comparison of biochemical relapse-free survival between primary gleason score 3 and primary gleason score 4 for biopsy gleason score 7 prostate cancer. **Int J Radiat Oncol. Biol Phys** 2009; 73:1439-45.

Breast Cancer Linkage Consortium. Cancer risks in BRCA2 mutation carriers. **J Natl Cancer Inst** 1999; 91:1310-6.

Bronner IF, Quail MA, Turner DJ, Swerdlow H. **Europe PMC Funders Group Improved Protocols for Illumina Sequencing**. 2009; 018:1-46.

Buyyounouski MK, Choyke PL, McKenney JK, et al. Prostate cancer - major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**. 2017; 67(3), 245–253.

Carter HB, Pearson JD, Metter EJ, et al. Longitudinal evaluation of prostate-specific antigen levels in men with and without prostate disease. **JAMA** 1992; 267:2215-20.

Cavanagh H, Rogers KMA. The role of BRCA1 and BRCA2 mutations in prostate, pancreatic and stomach cancers. **Hered Cancer Clin Pract** 2015; 13:16.

Center MM, Jemal A, Lortet-Tieulent J, et al. International variation in prostate cancer incidence and mortality rates. **Eur Urol** 2012; 61:1079-92.

Chan JM, Gann PH, Giovannucci EL. Role of diet in prostate cancer development and progression. **J Clin Oncol** 2005; 23:8152-60.

Chan TY, Partin AW, Walsh PC, Epstein JI. Prognostic significance of Gleason score 3+4 versus Gleason score 4+3 tumor at radical prostatectomy. **Urology** 2000; 56:823-7.

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

Coakley FV, Hricak H. Radiologic anatomy of the prostate gland: a clinical approach. **Radiol Clin North Am** 2000; 38:15-30.

Coldman AJ, Phillips N, Pickles TA. Trends in prostate cancer incidence and mortality: an analysis of mortality change by screening intensity. **CMAJ** 2003; 168:31-5.

Crona J, Ljungström V, Welin S, Walz MK, Hellman P, Björklund P. Bioinformatic challenges in clinical diagnostic application of targeted next generation sequencing: experience from pheochromocytoma. **PLoS One** 2015; 10:1-16.

D'Amico AV, Whittington R, Malkowicz SB, et al. Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer. **JAMA** 1998; 280:969-74.

Dall'era MA, Cooperberg MR, Chan JM, et al. Active surveillance for early-stage prostate cancer: Review of the current literature. **Cancer** 2008; 112:1650-9.

De Nunzio C, Kramer G, Marberger M, et al. The controversial relationship between benign prostatic hyperplasia and prostate cancer: the role of inflammation. **Eur Urol** 2011; 60:106-17.

Dennis LK, Dawson D V, Resnick MI. Vasectomy and the risk of prostate cancer: a meta-analysis examining vasectomy status, age at vasectomy, and time since vasectomy. **Prostate Cancer Prostatic Dis** 2002; 5:193-203.

Dennis LK, Dawson DV. Meta-analysis of measures of sexual activity and prostate cancer. **Epidemiology** 2002; 13:72-9.

Djavan B, Zlotta A, Remzi M, et al. Optimal predictors of prostate cancer on repeat prostate biopsy: a prospective study of 1,051 men. **J Urol** 2000; 163:1144-8-9.

Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. **Ann Surg Oncol** 2010; 17:1471-4.

Epstein JI, Allsbrook WCJ, Amin MB, Egevad LL. The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. **Am J Surg Pathol** 2005; 29:1228-42.

Epstein JI, Shen MM, Abate-Shen C, et al. The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason grading of prostatic carcinoma: definition of grading patterns and proposal for a new grading system. **PLoS One** 2013; 8:244-52.

Epstein JI. A new contemporary prostate cancer grading system: message to the Italian pathologists. **Pathologica** 2015; 107:205-7.

Febbo PG. Genomic approaches to outcome prediction in prostate cancer. **Cancer** 2009; 115:3046-57.

Fleischmann A, Saramäki OR, Zlobec I, et al. Prevalence and prognostic significance of TMPRSS2-ERG gene fusion in lymph node positive prostate cancers. **Prostate** 2014; 74:1647-54.

Fraass BA. The development of conformal radiation therapy. **Med Physics** 1995; 22:1911-21.

Fraga MF, Ballestar E, Villar-Garea A, et al. Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. **Nat Genet** 2005; 37:391-400.

Fraser M, Sabelnykova VY, Yamaguchi TN, et al. Genomic hallmarks of localized, non-indolent prostate cancer. **Nature** 2017; 541:359-64.

Frauscher F, Klauser A, Volgger H, et al. Comparison of contrast enhanced color Doppler targeted biopsy with conventional systematic biopsy: impact on prostate cancer detection. **J Urol** 2002; 167:1648-52.

Gasi D, Van der Korput HA, Douben HC, et al. Overexpression of full-length ETV1 transcripts in clinical prostate cancer due to gene translocation. **PLoS One** 2011; 6:e16332.

Gleason DF. Classification of prostatic carcinomas. **Cancer Chemother Rep** 1966; 50:125-8.

Gleason DF, Mellinger GT, Arduino LJ, et al. Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. **J Urol** 1974; 197:S134-S139.

Goldberg AD, Allis CD, Bernstein E. Epigenetics: a landscape takes shape. **Cell** 2007; 128:635-8.

Goldgar DE, Easton DF, Cannon-Albright LA, Skolnick MH. Systematic population-based assessment of cancer risk in first-degree relatives of cancer probands. **J Natl Cancer Inst** 1994; 86:1600-8.

Grasso CS, Wu Y-M, Robinson DR, et al. The mutational landscape of lethal castration-resistant prostate cancer. **Nature** 2012; 487:239-43.

Greene FL, Sobin LH. The TNM system: our language for cancer care. **J Surg Oncol** 2002; 80:119-20.

Greenlee RT, Hill-Harmon MB, Murray T, Thun M. Cancer statistics, 2001. **CA Cancer J Clin** 2001; 51:15-36.

Grönberg H, Damber L, Jonson H, Damber JE. Prostate cancer mortality in northern Sweden, with special reference to tumor grade and patient age. **Urology** 1997; 49:374-8.

Grubb RL, Pinsky PF, Greenlee RT, et al. Prostate cancer screening in the prostate, lung, colorectal and ovarian cancer screening trial: update on findings from the initial four rounds of screening in a randomized trial. **BJU Int** 2008; 102:1524-30.

Hagen RM, Adamo P, Karamat S, et al. Quantitative analysis of ERG expression and its splice isoforms in formalin-fixed, paraffin-embedded prostate cancer samples: Association with seminal vesicle invasion and biochemical recurrence. **Am J Clin Pathol** 2014; 142:533-40.

Han M, Partin AW, Zahurak M, Piantadosi S, Epstein JI, Walsh PC. Biochemical (prostate specific antigen) recurrence probability following radical prostatectomy for clinically localized prostate cancer. **J Urol** 2003; 169:517-23.

Heidenreich A, Bellmunt J, Bolla M, et al. EAU guidelines on prostate cancer. Part 1: Screening, diagnosis, and treatment of clinically localised disease. **Eur Urol** 2011; 59:61-71.

Hieronimus H, Schultz N, Gopalan A, et al. Copy number alteration burden predicts prostate cancer relapse. **Proc Natl Acad Sci USA** 2014; 111:11139-44.

Hugosson J, Aus G, Lilja H, Lodding P, Pihl C-G. Results of a randomized, population-based study of biennial screening using serum prostate-specific antigen measurement to detect prostate carcinoma. **Cancer** 2004; 100:1397-405.

Husarik DB, Miralbell R, Dubs M, et al. Evaluation of [18F]-choline PET/CT for staging and restaging of prostate cancer. **Eur J Nucl Med Mol Imaging** 2008; 35:253-63.

Ilyin SE, Belkowski SM, Plata-Salamán CR. Biomarker discovery and validation: technologies and integrative approaches. **Trends Biotechnol** 2004; 22:411-6.

Iremashvili V, Pelaez L, Manoharan M, Jorda M, Rosenberg DL, Soloway MS. Pathologic prostate cancer characteristics in patients eligible for active surveillance: a head-to-head comparison of contemporary protocols. **Eur Urol** 2012; 62:462-8.

Jerónimo C, Henrique R, Hoque MO, et al. A quantitative promoter methylation profile of prostate cancer a quantitative promoter methylation profile of prostate cancer. **Biosystems** 2004; 10:8472-8.

Jin JK, Dayyani F, Gallick GE. Steps in prostate cancer progression that lead to bone metastasis. **Int J Cancer** 2011; 128:2545-61.

Johns LE, Houlston RS. A systematic review and meta-analysis of familial prostate cancer risk. **BJU Int** 2003; 91:789-94.

Junqueira LC, Carneiro J. **Histologia básica**. 10ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004. Aparelho reprodutor masculino; p.423.

Kan Z, Jaiswal BS, Stinson J, et al. Diverse somatic mutation patterns and pathway alterations in human cancers. **Nature** 2010; 466:869-873.

Kang GH, Lee S, Lee HJ, Hwang KS. Aberrant CpG island hypermethylation of multiple genes in prostate cancer and prostatic intraepithelial neoplasia. **J Pathol** 2004; 202:233-40.



Kestin LL, Goldstein NS, Vicini FA, et al. Pathologic evidence of dose-response and dose-volume relationships for prostate cancer treated with combined external beam radiotherapy and high-dose-rate brachytherapy. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 2002; 54:107-18.

Klotz L, Zhang L, Lam A, Nam R, Mamedov A, Loblaw A. Clinical results of long-term follow-up of a large, active surveillance cohort with localized prostate cancer. **J Clin Oncol** 2010; 28:126-31.

Klotz L. Active surveillance for prostate cancer: For whom? **J Clin Oncol** 2005; 23:8165-9.

Kommu S, Edwards S, Eeles R. The clinical genetics of prostate cancer. **Hered Cancer Clin Pract** 2004; 2:111-21.

König JE, Senge T, Allhoff EP, König W. Analysis of the inflammatory network in benign prostate hyperplasia and prostate cancer. **Prostate** 2004; 58:121-9.

Krøigård AB, Thomassen M, Lænkholm AV, Kruse TA, Larsen MJ. Evaluation of nine somatic variant callers for detection of somatic mutations in exome and targeted deep sequencing data. **PLoS One** 2016; 11:1-15.

Kumar A, White TA, MacKenzie AP, et al. Exome sequencing identifies a spectrum of mutation frequencies in advanced and lethal prostate cancers. **Proc Natl Acad Sci USA** 2011; 108:17087-92.

Kumar A, Coleman I, Morrissey C, et al. Substantial interindividual and limited intraindividual genomic diversity among tumors from men with metastatic prostate cancer. **Nat Med** 2016; 22:369-78.

Lalonde E, Ishkanian AS, Sykes J, et al. Tumour genomic and microenvironmental heterogeneity for integrated prediction of 5-year biochemical recurrence of prostate cancer: a retrospective cohort study. **Lancet Oncol** 2014; 15:1521-32.

Lau WK, Blute ML, Bostwick DG, Weaver AL, Sebo TJ, Zincke H. Prognostic factors for survival of patients with pathological Gleason score 7 prostate cancer: differences in outcome between primary Gleason grades 3 and 4. **J Urol** 2001; 166:1692-7.

Lee CH, Akin-Olugbade O, Kirschenbaum A. Overview of prostate anatomy, histology, and pathology. **Endocrinol Metab Clin North Am** 2011; 40:565-75.

Lee WH, Morton RA, Epstein JI, et al. Cytidine methylation of regulatory sequences near the pi-class glutathione S-transferase gene accompanies human prostatic carcinogenesis. **Proc Natl Acad Sci USA** 1994; 91:11733-7.

Leyten GHJM, Hessels D, Smit FP, et al. Identification of a candidate gene panel for the early diagnosis of prostate cancer. **Clin Cancer Res** 2015; 21:3061-70.

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

Liang C-Z, Li H-J, Wang Z-P, et al. Treatment of chronic prostatitis in Chinese men. **Asian J Androl** 2009; 11:153-6.

Lin H-P, Lin C-Y, Liu C-C, et al. Caffeic acid phenethyl ester as a potential treatment for advanced prostate cancer targeting akt signaling. **Int J Mol Sci** 2013; 14:5264-83.

Lilja H, Ulmert D, Vickers AJ. Prostate-specific antigen and prostate cancer: prediction, detection and monitoring. **Nat Rev Cancer** 2008; 8:268-78.

Lindberg J, Mills IG, Klevebring D, et al. The mitochondrial and autosomal mutation landscapes of prostate cancer. **Eur Urol** 2013; 63:702-8.

Lu-Yao G, Albertsen PC, Stanford JL, Stukel TA, Walker-Corkery E, Barry MJ. Screening, treatment, and prostate cancer mortality in the Seattle area and Connecticut: fifteen-year follow-up. **J Gen Intern Med** 2008; 23:1809-14.

Määttänen L, Hakama M, Tammela TLJ, et al. Specificity of serum prostate-specific antigen determination in the Finnish prostate cancer screening trial. **Br J Cancer** 2007; 96:56-60.

Mackinnon AC, Yan BC, Joseph LJ, Al-Ahmadie HA. Molecular biology underlying the clinical heterogeneity of prostate cancer: an update. **Arch Pathol Lab Med** 2009; 133:1033-40.

Manson-Bahr D, Ball R, Gudem G, et al. Mutation detection in formalin-fixed prostate cancer biopsies taken at the time of diagnosis using next-generation DNA sequencing. **J Clin Pathol** 2015; 68:212-7.

McNeal JE. The zonal anatomy of the prostate. **Prostate** 1981; 2:35-49.

Messing EM, Manola J, Yao J, et al. Immediate versus deferred androgen deprivation treatment in patients with node-positive prostate cancer after radical prostatectomy and pelvic lymphadenectomy. **Lancet Oncol** 2006; 7:472-9.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer José de Alencar Gomes da Silva. **Estimativa/2016 Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2016.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer José de Alencar Gomes da Silva. **Estadiamento**. Disponível em: <URL:[http://www.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?ID=54](http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?ID=54)>. [2017a fev 15].

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer José de Alencar Gomes da Silva. **Próstata 2017**. Disponível em: <URL:<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/prostata>> [2017b fev 15].

Mounir Z, Lin F, Lin VG, et al. TMPRSS2: ERG blocks neuroendocrine and luminal cell differentiation to maintain prostate cancer proliferation. **Oncogene** 2015; 34:3815-25.

Nelson WG, De Marzo AM, DeWeese TL, Isaacs WB. The role of inflammation in the pathogenesis of prostate cancer. **J Urol** 2004; 172:S6-11; discussion S11-2.

Netter FH. **Atlas de anatomia humana**. 2ª ed. 2000. <URL:<http://www.auladeanatomia.com/novosite/sistemas/sistema-genital/sistema-genital-masculino/prostata/>> [2017 jan 13]

Nickel JC. Inflammation and benign prostatic hyperplasia. **Urol Clin North Am** 2008; 35:109-15; vii.

Nickel JC. Prostatitis: lessons from the 20th century. **BJU Int** 2000; 85:179-85.

Oesterling JE, Jacobsen SJ, Chute CG, et al. Serum prostate-specific antigen in a community-based population of healthy men. Establishment of age-specific reference ranges. **JAMA** 1993; 270:860-4.

Okada H, Tsubura A, Okamura A, et al. Keratin profiles in normal/hyperplastic prostates and prostate carcinoma. **Virch Arch A Pathol Anat Histopathol** 1992; 421:157-61.

Paparel P, Cronin AM, Savage C, Scardino PT, Eastham JA. Oncologic outcome and patterns of recurrence after salvage radical prostatectomy. **Eur Urol** 2009; 55:404-11.

Parker SL, Tong T, Bolden S, Wingo P A. Cancer statistics, 1996. **CA Cancer J Clin** 1996; 46:5-27.

Partin AW, Catalona WJ, Southwick PC, Subong ENP, Gasior GH, Chan DW. Analysis of percent free prostate-specific antigen (PSA) for prostate cancer detection: influence of total PSA, prostate volume, and age. **Urology** 1996; 48:55-61.

Patel AR. Risk factors for prostate cancer. **Ann Intern Med** 2008; 118:793-803.

Patel RK, Jain M. NGS QC toolkit: A toolkit for quality control of next generation sequencing data. **PLoS One** 2012; 7:e30619.

Pierorazio PM, Walsh PC, Partin AW, Epstein JI. Prognostic Gleason grade grouping: Data based on the modified Gleason scoring system. **BJU Int** 2013; 111:753-60.

Pritchard CC, Morrissey C, Kumar A, et al. Complex MSH2 and MSH6 mutations in hypermutated microsatellite unstable advanced prostate cancer. **Nat Commun** 2014; 5:4988.

Pryor MB, Schellhammer PF. The pursuit of prostate cancer in patients with a rising prostate-specific antigen and multiple negative transrectal ultrasound-guided prostate biopsies. **Clin Prostate Cancer** 2002; 1:172-6.

Quinn M, Babb P. Patterns and trends in prostate cancer incidence, survival, prevalence and mortality. Part I: international comparisons. **BJU Int** 2002; 90:162-73.

Rasiah KK, Stricker PD, Haynes AM, et al. Prognostic significance of Gleason pattern in patients with Gleason Score 7 prostate carcinoma. **Cancer** 2003; 98:2560-5.

Rifkin MD, Dähnert W, Kurtz AB. State of the art: endorectal sonography of the prostate gland. **AJR Am J Roentgenol** 1990; 154:691-700.

Robinson D, Van Allen EM, Wu YM, et al. Integrative clinical genomics of advanced prostate cancer. **Cell** 2015; 161:1215-28.

Sardana G, Dowell B, Diamandis EP. Emerging biomarkers for the diagnosis and prognosis of prostate cancer. **Clin Chem** 2008; 54:1951-60.

Schaid DJ. The complex genetic epidemiology of prostate cancer. **Hum Mol Genet** 2004; 13 Spec No:R103-21.

Schalken JA, Bergh A, Bono A, et al. Molecular prostate cancer pathology: current issues and achievements. **Scand J Urol Nephrol Suppl** 2005; (216):82-93.

Seligson DB, Horvath S, Shi T, et al. Global histone modification patterns predict risk of prostate cancer recurrence. **Nature** 2005; 435:1262-6.

Selman SH. The McNeal prostate: a review. **Urology** 2011; 78:1224-8.

Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in cancer. **Carcinogenesis** 2009; 31:27-36.

Shelley MD, Kumar S, Wilt T, Staffurth J, Coles B, Mason MD. A systematic review and meta-analysis of randomised trials of neo-adjuvant hormone therapy for localised and locally advanced prostate carcinoma. **Cancer Treat Rev** 2009; 35:9-17.

Schmid HP. Tumour markers in patients on deferred treatment: prostate specific antigen doubling times. **Cancer Surv** 1995; 23:157-67.

Smith T, Waterman T. Identification of common molecular subsequences. **J Mol Biol** 1981; 147:195-7.

Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics. **CA Cancer J Clin** 2016; 66:7-30.

Simmons MN, Stephenson AJ, Klein EA. Natural history of biochemical recurrence after radical prostatectomy: risk assessment for secondary therapy. **Eur Urol** 2007; 51:1175-84.

Singal R, Ferdinand L, Reis IM, Schlesselman JJ. Methylation of multiple genes in prostate cancer and the relationship with clinicopathological features of disease. **Oncol Rep** 2004; 12:631-7.

Sowalsky AG, Kissick HT, Gerrin SJ, et al. Gleason score 7 prostate cancers emerge through branched evolution of clonal gleason pattern 3 and 4. **Clin Cancer Res** 2017 Jan 24. [Epub ahead of print]

Stanford JL, Hamilton AS, Gilliland FD, et al. After radical prostatectomy for clinically localized prostate cancer the prostate cancer outcomes study. **JAMA** 2000; 283:354-60.

Tareen B, Godoy G, Taneja SS. Focal therapy: a new paradigm for the treatment of prostate cancer. **Rev Urol** 2009; 11:203-12.

Taylor BS, Schultz N, Hieronymus H, et al. Integrative genomic profiling of human prostate cancer. **Cancer Cell** 2010; 18:11-22.

Thompson IM, Pauler DK, Goodman PJ, et al. Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level  $\leq$  4.0 ng per milliliter. **N Engl J Med** 2004; 350:2239–46.

Tomlins S A, Rhodes DR, Perner S, et al. Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. **Science** 2005; 310:644-8.

Tomlins SA, Bjartell A, Chinnaiyan AM, et al. ETS gene fusions in prostate cancer: from discovery to daily clinical practice. **Eur Urol** 2009; 56:275-86.

Tosoian JJ, Trock BJ, Landis P, et al. Active surveillance program for prostate cancer: an update of the Johns Hopkins experience. **J Clin Oncol** 2011; 29:2185-90.

Tseng C-H. Benign prostatic hyperplasia is a significant risk factor for bladder cancer in diabetic patients: a population-based cohort study using the National Health Insurance in Taiwan. **BMC Cancer** 2013; 13:7.

Urologia online. Dr. Paulo de Almeida Rocha. **Patologias e sintomas**. 2000. Disponível em: <URL:<http://www.uro.com.br/prostexto.htm>> [2017 fev 12]

Vickers AJ, Ulmert D, Serio AM, et al. The predictive value of prostate cancer biomarkers depends on age and time to diagnosis: towards a biologically-based screening strategy. **Int J Cancer** 2007; 121:2212-7.



Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA Jr, Kinzler KW. Cancer genome landscapes. **Science** 2013; 339:1546-58.

Wang J, Duncan D, Shi Z, Zhang B. WEB-based GEne SeT AnaLysis Toolkit (WebGestalt): update 2013. **Nucleic Acids Res** 2013; 41:77-83.

Wang GG, Allis CD, Chi P. Chromatin remodeling and cancer, part I: covalent histone modifications. **Trends Mol Med** 2007a; 13:363-72.

Wang GG, Allis CD, Chi P. Chromatin remodeling and cancer, part II: ATP-dependent chromatin remodeling. **Trends Mol Med** 2007b; 13:373-80.

Weidner W, Wagenlehner FME, Marconi M, Pilatz A, Pantke KHP, Diemer T. Acute bacterial prostatitis and chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome: andrological implications. **Andrologia** 2008; 40:105-12.

Welch HG, Black WC. Overdiagnosis in cancer. **J Natl Cancer Inst** 2010; 102:605-13.

Whitmore WFJ, Whitmore Jr. WF. Interstitial radiation therapy for carcinoma of the prostate. **Prostate** 1980; 1:157-68.

Wong YN, Freedland S, Egleston B, Hitdes G, Schwartz JS, Armstrong K. Role of androgen deprivation therapy for node-positive prostate cancer. **J Clin Oncol** 2009; 27:100-5.

Xia S-J, Cui D, Jiang Q. An overview of prostate diseases and their characteristics specific to asian men. **Asian J Androl** 2012; 14:458-64.

Xu X, Zhu K, Liu F, et al. Identification of somatic mutations in human prostate cancer by RNA-Seq. **Gene** 2013; 519:343-7.

Yadav SS, Li J, Lavery HJ, Yadav KK, Tewari AK. Next-generation sequencing technology in prostate cancer diagnosis, prognosis, and personalized treatment. **Urol Oncol Semin Orig Investig** 2015; 33:267.e1-267.e13.

Yegnasubramanian S, Kowalski J, Gonzalzo ML, et al. Hydrogen sulfide represses androgen receptor transactivation by targeting at the second zinc finger module. **Cancer Res** 2004; 9:31-6.

Young HH. VIII. Conservative perineal prostatectomy: the results of two years' experience and report of seventy-five cases. **Ann Surg** 1905; 41:549-57.

Wein AJ. Diagnosis and staging of prostate cancer. In: Carter HB, Allaf ME, Partin AW, editors. **Campbell-Walsh urology ninth edition review**. 9<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Saunders/Elsevier; 2007. p.2912-31.

Zhang B, Kirov S, Snoddy J. WebGestalt: An integrated system for exploring gene sets in various biological contexts. **Nucleic Acids Res** 2005; 33:741-48.

## 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, 17 de Julho de 2015.

À


**Dra. Elisa Napolitano e Ferreira**  
**Aluna: Isabella Tanus Job e Meira (Mestrado)**

**Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 2064/15B**  
**“Identificação de mutações somáticas em adenocarcinoma de próstata com escore de Gleason 7 e suas associações com recidiva bioquímica.”**

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 14/07/2015, **tomaram conhecimento e aprovaram** os seguintes documentos:

- Solicitação de dispensa da submissão da documentação obrigatória e análise ética do projeto acima mencionado por se tratar de um projeto afiliado ao temático intitulado “Definição do perfil de mutações somáticas em adenocarcinoma de próstata e sua relação com características clínico-patológicas e fatores prognósticos.”, registrado neste CEP sob nº 2064/15. O projeto afiliado em referência será Dissertação de Mestrado da aluna: Isabella Tanus Job e Meira.
- Dissertação de Mestrado, datado de 2015.

Atenciosamente,

  
**Dr. Antônio Hugo José Fróes Marques Campos**  
**2º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa**

1/1

Anexo 2 – Informações clínicas dos pacientes selecionados para este estudo

Nome da Amostra		Idade ao diagnóstico	Escore de Gleason da peça cirurgica	Recidiva Bioquímica	PSA (ng/mL)			Linfonodos	Estadio Clínico	Seguimento em anos	Óbito	Metástase
Tumor	Normal				PSA pré cirúrgico	1º PSA pós	1º PSA > 0.2					
T30	B30	75	3+4=7	Sim	10,39	0,090	0,408	5/0	II	5	Não	-
T11	B11	50	3+4=7	Sim	6,24	0,070	0,560	2/0	II	8	Não	Óssea
T12	SG12	55	4+3=7	Sim	3,34	<0.003	2,460	9/0	II	4	Não	Óssea
T13	SG13	62	3+4=7	Sim	4,30	0,061	0,215	5/0	X	2	Sim <sup>o</sup>	-
T29	SG29	53	3+4=7	Sim	5,50	0,009	0,197	5/0	II	6	Não	-
T09	SG09	71	3+4=7	Sim	4,18	0,100	0,260	15/0	II	6	Não	-
T15	SG15	57	4+3=7	Sim	7,49	0,022	0,256	6/0	II	5	Não	Óssea
T34	SG34	54	4+3=7	Sim	8,00	0,064	0,206	6/0	II	6	Não	-
T16	SG16	76	4+3=7	Sim	4,40	0,005	0,580	9/0	II	6	Não	-
T17	SG17	67	4+3=7	Sim	11,70	0,250	0,610	5/0	II	3	Não	-
T05	SG05	58	3+5=8	Sim	3,96	0,003	0,230	14/0	II	4	Não	-
T24	SG24	68	5+3=8	Sim	10,00	0,033	0,312	12/0	-	4	Não	-
T23	SG23	57	4+3=7	Sim	4,15	0,010	0,350	2/0	-	4	Não	-
T25	SG25	62	3+4=7	Sim	9,88	0,390	1,100	5/0	II	3	Não	-
T10	B10	72	3+4=7	Sim	6,80	0,053	0,220	2/0	III	11	Não	-
T06	SG06	64	3+4=7	Sim	8,93	0,030	0,840	3/0	III	3	Não	-
T42	-	52	3+4=7	Sim	4,31	0,050	0,210	5/0	-	5	Não	-
T43	-	71	3+4=7	Sim	5,40	0,110	0,490	6/0	-	7	Não	-
T38	-	57	4+3=7	Sim	10,91	0,069	0,208	4/0	-	5	Não	-
T39	-	58	3+4=7	Sim	8,60	0,064	0,197	2/0	-	3	Sim <sup>#</sup>	-
T40	-	63	4+3=7	Sim	3,11	0,122	0,335	14/0	-	7	Não	-
T33	B33	50	4+3=7	Não	8,00	< 0.003	-	10/0	X	7	Não	-
T14	SG14	59	3+4=7	Não	10,35	0,021	-	8/0	II	4	Não	-
T26	SG26	58	4+3=7	Não	6,90	<0.01	-	6/0	III	6	Não	-
T27	SG27	62	3+4=7	Não	4,92	0,006	-	2/0	II	5	Não	-
T08	SG08	62	3+4=7	Não	2,60	0,004	-	11/0	II	5	Não	-
T07	SG07	57	3+4=7	Não	4,40	0,003	-	10/0	III	5	Não	-
T04	SG04	67	4+3=7	Não	3,96	0,003	-	18/0	II	6	Não	-
T28	SG28	61	3+4=7	Não	9,96	0,010	-	11/0	I	5	Não	-

T21	SG21	60	3+4=7	Não	2,19	0,006	-	3/0	I	6	Não	-
T22	SG22	62	3+4=7	Não	4,03	0,001	-	5/0	II	6	Não	-
T18	SG18	54	3+4=7	Não	15,67	0,003	-	4/0	II	4	Não	-
T20	SG20	57	3+4=7	Não	6,31	0,020	-	3/0	I	6	Não	-
T19	SG19	51	4+3=7	Não	5,03	<0.003	-	9/0	II	6	Não	-
T02	SG02	62	3+4=7	Não	5,24	<0.003	-	4/0	II	5	Não	-
T01	SG01	63	3+4=7	Não	9,53	0,003	-	9/0	II	8	Não	-
T03	SG03	52	3+4=7	Não	4,04	0,005	-	8/0	-	7	Não	-
T31	B31	42	3+4=7	Não	10,40	>0.003	-	6/0	I	6	Não	-
T35	B35	67	3+4=7	Não	5,66	0,009	-	12/0	II	7	Não	-
T32	B32	52	3+4=7	Não	4,30	0,012	-	4/0	I	10	Não	-
T37	-	48	3+4=7	Não	4,67	0,003	-	8/0	-	9	Não	-
T41	-	58	4+3=7	Não	6,50	0,008	-	9/0	-	10	Não	-
T36	-	63	3+4=7	Não	3,85	< 0.003	-	2/0	-	11	Não	-

Legenda: T – Tumor; SG – Leucócito; B – Borda; <sup>o</sup> Óbito por glioblastoma; <sup>#</sup> Óbito por causa desconhecida; X –Estadio clínico não avaliável.

**Anexo 3 - Regiões inseridas para a construção do painel de genes customizado**

Cromossomo	Coordenadas		Genes alvos	Região do alvo	Cobertura da região (%)
	Início	Final			
chr1	6206270	6206933	<i>CHD5</i>	Região codificante	100%
chr1	6188557	6189131	<i>CHD5</i>	Região codificante	100%
chr1	6208912	6209474	<i>CHD5</i>	Região codificante	100%
chr1	6171833	6172339	<i>CHD5</i>	Região codificante	100%
chr1	6166341	6166841	<i>CHD5</i>	Região codificante	100%
chr1	6202186	6202667	<i>CHD5</i>	Região codificante	100%
chr1	6181163	6181635	<i>CHD5</i>	Região codificante	100%
chr1	6196575	6196927	<i>CHD5</i>	Região codificante	100%
chr1	6185582	6185920	<i>CHD5</i>	Região codificante	100%
chr1	6203881	6204217	<i>CHD5</i>	Região codificante	100%
chr1	6214718	6214960	<i>CHD5</i>	Região codificante	100%
chr1	6169853	6170052	<i>CHD5</i>	Região codificante	100%
chr1	6219394	6219577	<i>CHD5</i>	Região codificante	100%
chr1	6186630	6186808	<i>CHD5</i>	Região codificante	100%
chr1	6195288	6195465	<i>CHD5</i>	Região codificante	100%
chr1	6188104	6188280	<i>CHD5</i>	Região codificante	100%
chr1	6184006	6184169	<i>CHD5</i>	Região codificante	100%
chr1	6184575	6184723	<i>CHD5</i>	Região codificante	100%
chr1	6194776	6194921	<i>CHD5</i>	Região codificante	100%
chr1	6185158	6185295	<i>CHD5</i>	Região codificante	100%
chr1	6170452	6170588	<i>CHD5</i>	Região codificante	100%
chr1	6194186	6194321	<i>CHD5</i>	Região codificante	100%
chr1	6228208	6228339	<i>CHD5</i>	Região codificante	100%
chr1	6212470	6212598	<i>CHD5</i>	Região codificante	100%
chr1	6190262	6190390	<i>CHD5</i>	Região codificante	100%
chr1	6211090	6211217	<i>CHD5</i>	Região codificante	100%
chr1	6215657	6215779	<i>CHD5</i>	Região codificante	100%
chr1	6191689	6191810	<i>CHD5</i>	Região codificante	100%
chr1	6172967	6173060	<i>CHD5</i>	Região codificante	100%
chr1	6240003	6240085	<i>CHD5</i>	Região codificante	100%
chr1	11292491	11292587	<i>MTOR</i>	Região codificante	98%
chr1	11298457	11298676	<i>MTOR</i>	Região codificante	100%
chr1	11186677	11187203	<i>MTOR</i>	Região codificante	100%
chr1	11290980	11291493	<i>MTOR</i>	Região codificante	100%
chr1	11187679	11188185	<i>MTOR</i>	Região codificante	100%
chr1	11307680	11308153	<i>MTOR</i>	Região codificante	100%
chr1	11259313	11259762	<i>MTOR</i>	Região codificante	100%
chr1	11169345	11169788	<i>MTOR</i>	Região codificante	100%
chr1	11204703	11205104	<i>MTOR</i>	Região codificante	100%
chr1	11199359	11199717	<i>MTOR</i>	Região codificante	100%
chr1	11288723	11288977	<i>MTOR</i>	Região codificante	100%

chr1	11190584	11190836	<i>MTOR</i>	Região codificante	100%
chr1	11300358	11300606	<i>MTOR</i>	Região codificante	100%
chr1	11316988	11317224	<i>MTOR</i>	Região codificante	100%
chr1	11297898	11298107	<i>MTOR</i>	Região codificante	100%
chr1	11316047	11316251	<i>MTOR</i>	Região codificante	100%
chr1	11303169	11303359	<i>MTOR</i>	Região codificante	100%
chr1	11273454	11273625	<i>MTOR</i>	Região codificante	100%
chr1	11272367	11272533	<i>MTOR</i>	Região codificante	100%
chr1	11319303	11319468	<i>MTOR</i>	Região codificante	100%
chr1	11182034	11182185	<i>MTOR</i>	Região codificante	100%
chr1	11269367	11269517	<i>MTOR</i>	Região codificante	100%
chr1	11264616	11264762	<i>MTOR</i>	Região codificante	100%
chr1	11217207	11217350	<i>MTOR</i>	Região codificante	100%
chr1	11184553	11184692	<i>MTOR</i>	Região codificante	100%
chr1	11174373	11174512	<i>MTOR</i>	Região codificante	100%
chr1	11313894	11314032	<i>MTOR</i>	Região codificante	100%
chr1	11301608	11301740	<i>MTOR</i>	Região codificante	100%
chr1	11294198	11294324	<i>MTOR</i>	Região codificante	100%
chr1	11181301	11181427	<i>MTOR</i>	Região codificante	100%
chr1	11193135	11193256	<i>MTOR</i>	Região codificante	100%
chr1	11206731	11206850	<i>MTOR</i>	Região codificante	100%
chr1	11194406	11194525	<i>MTOR</i>	Região codificante	100%
chr1	11272851	11272967	<i>MTOR</i>	Região codificante	100%
chr1	11318540	11318652	<i>MTOR</i>	Região codificante	100%
chr1	11168236	11168345	<i>MTOR</i>	Região codificante	100%
chr1	11210181	11210285	<i>MTOR</i>	Região codificante	100%
chr1	11189793	11189897	<i>MTOR</i>	Região codificante	100%
chr1	11188509	11188611	<i>MTOR</i>	Região codificante	100%
chr1	11188910	11189010	<i>MTOR</i>	Região codificante	100%
chr1	11270869	11270965	<i>MTOR</i>	Região codificante	100%
chr1	11293453	11293546	<i>MTOR</i>	Região codificante	100%
chr1	11276203	11276293	<i>MTOR</i>	Região codificante	100%
chr1	11177059	11177145	<i>MTOR</i>	Região codificante	100%
chr1	11227497	11227576	<i>MTOR</i>	Região codificante	100%
chr1	11174868	11174946	<i>MTOR</i>	Região codificante	100%
chr1	11175451	11175527	<i>MTOR</i>	Região codificante	100%
chr1	11172907	11172976	<i>MTOR</i>	Região codificante	100%
chr1	11167543	11167559	<i>MTOR</i>	Região codificante	100%
chr1	115256419	115256601	<i>NRAS</i>	Éxon 3	100%
chr1	115252188	115252351	<i>NRAS</i>	Éxon 4	100%
chr1	115258669	115258783	<i>NRAS</i>	Éxon 2	100%
chr1	1153836	1154309	<i>SDF4</i>	Região codificante	100%
chr1	1163846	1164175	<i>SDF4</i>	Região codificante	100%
chr1	1159210	1159350	<i>SDF4</i>	Região codificante	100%
chr1	1153048	1153186	<i>SDF4</i>	Região codificante	100%
chr1	1158622	1158739	<i>SDF4</i>	Região codificante	100%

chr10	123324950	123325220	<i>FGFR2</i>	Região codificante	100%
chr10	123274629	123274835	<i>FGFR2</i>	Região codificante	100%
chr10	123279491	123279685	<i>FGFR2</i>	Região codificante	100%
chr10	123256044	123256238	<i>FGFR2</i>	Região codificante	100%
chr10	123310802	123310975	<i>FGFR2</i>	Região codificante	100%
chr10	123239372	123239537	<i>FGFR2</i>	Região codificante	100%
chr10	123263302	123263457	<i>FGFR2</i>	Região codificante	100%
chr10	123278194	123278345	<i>FGFR2</i>	Região codificante	100%
chr10	123244907	123245048	<i>FGFR2</i>	Região codificante	100%
chr10	123298104	123298231	<i>FGFR2</i>	Região codificante	100%
chr10	123247503	123247629	<i>FGFR2</i>	Região codificante	100%
chr10	123260338	123260463	<i>FGFR2</i>	Região codificante	100%
chr10	123258007	123258121	<i>FGFR2</i>	Região codificante	100%
chr10	123353221	123353333	<i>FGFR2</i>	Região codificante	100%
chr10	123243210	123243319	<i>FGFR2</i>	Região codificante	100%
chr10	123324014	123324095	<i>FGFR2</i>	Região codificante	100%
chr10	123246866	123246940	<i>FGFR2</i>	Região codificante	100%
chr10	89692768	89693010	<i>PTEN</i>	Região codificante	100%
chr10	89720649	89720877	<i>PTEN</i>	Região codificante	100%
chr10	89725042	89725228	<i>PTEN</i>	Região codificante	100%
chr10	89717608	89717778	<i>PTEN</i>	Região codificante	100%
chr10	89711873	89712018	<i>PTEN</i>	Região codificante	100%
chr10	89653780	89653868	<i>PTEN</i>	Região codificante	100%
chr10	89624225	89624307	<i>PTEN</i>	Região codificante	100%
chr10	89685268	89685316	<i>PTEN</i>	Região codificante	100%
chr10	89690801	89690848	<i>PTEN</i>	Região codificante	100%
chr10	43609926	43610186	<i>RET</i>	Éxon 11	100%
chr10	43615527	43615653	<i>RET</i>	Éxon 15	100%
chr10	43609002	43609125	<i>RET</i>	Éxon 10	100%
chr10	43613819	43613930	<i>RET</i>	Éxon 13	100%
chr10	43617392	43617466	<i>RET</i>	Éxon 16	100%
chr11	108199746	108199967	<i>ATM</i>	Região codificante	38%
chr11	108235807	108236234	<i>ATM</i>	Região codificante	100%
chr11	108121426	108121801	<i>ATM</i>	Região codificante	100%
chr11	108141789	108142135	<i>ATM</i>	Região codificante	100%
chr11	108143257	108143581	<i>ATM</i>	Região codificante	100%
chr11	108186548	108186842	<i>ATM</i>	Região codificante	100%
chr11	108098350	108098617	<i>ATM</i>	Região codificante	100%
chr11	108154952	108155202	<i>ATM</i>	Região codificante	100%
chr11	108115513	108115755	<i>ATM</i>	Região codificante	100%
chr11	108196035	108196273	<i>ATM</i>	Região codificante	100%
chr11	108124539	108124768	<i>ATM</i>	Região codificante	100%
chr11	108200939	108201150	<i>ATM</i>	Região codificante	100%
chr11	108160327	108160530	<i>ATM</i>	Região codificante	100%
chr11	108139135	108139338	<i>ATM</i>	Região codificante	100%
chr11	108122562	108122760	<i>ATM</i>	Região codificante	100%



chr11	108175400	108175581	<i>ATM</i>	Região codificante	100%
chr11	108173578	108173758	<i>ATM</i>	Região codificante	100%
chr11	108163344	108163522	<i>ATM</i>	Região codificante	100%
chr11	108151720	108151897	<i>ATM</i>	Região codificante	100%
chr11	108170439	108170614	<i>ATM</i>	Região codificante	100%
chr11	108137896	108138071	<i>ATM</i>	Região codificante	100%
chr11	108153435	108153608	<i>ATM</i>	Região codificante	100%
chr11	108119658	108119831	<i>ATM</i>	Região codificante	100%
chr11	108196783	108196954	<i>ATM</i>	Região codificante	100%
chr11	108216468	108216637	<i>ATM</i>	Região codificante	100%
chr11	108114678	108114847	<i>ATM</i>	Região codificante	100%
chr11	108164038	108164206	<i>ATM</i>	Região codificante	100%
chr11	108106395	108106563	<i>ATM</i>	Região codificante	100%
chr11	108117689	108117856	<i>ATM</i>	Região codificante	100%
chr11	108202604	108202766	<i>ATM</i>	Região codificante	100%
chr11	108180885	108181044	<i>ATM</i>	Região codificante	100%
chr11	108213947	108214100	<i>ATM</i>	Região codificante	100%
chr11	108188098	108188250	<i>ATM</i>	Região codificante	100%
chr11	108099903	108100052	<i>ATM</i>	Região codificante	100%
chr11	108172373	108172518	<i>ATM</i>	Região codificante	100%
chr11	108205694	108205838	<i>ATM</i>	Região codificante	100%
chr11	108203487	108203629	<i>ATM</i>	Região codificante	100%
chr11	108165652	108165788	<i>ATM</i>	Região codificante	100%
chr11	108159702	108159832	<i>ATM</i>	Região codificante	100%
chr11	108128206	108128335	<i>ATM</i>	Região codificante	100%
chr11	108126940	108127069	<i>ATM</i>	Região codificante	100%
chr11	108192026	108192149	<i>ATM</i>	Região codificante	100%
chr11	108150216	108150337	<i>ATM</i>	Região codificante	100%
chr11	108206570	108206690	<i>ATM</i>	Região codificante	100%
chr11	108158325	108158444	<i>ATM</i>	Região codificante	100%
chr11	108224491	108224609	<i>ATM</i>	Região codificante	100%
chr11	108202169	108202286	<i>ATM</i>	Região codificante	100%
chr11	108198370	108198487	<i>ATM</i>	Região codificante	100%
chr11	108190679	108190787	<i>ATM</i>	Região codificante	100%
chr11	108168012	108168111	<i>ATM</i>	Região codificante	100%
chr11	108123542	108123641	<i>ATM</i>	Região codificante	100%
chr11	108129711	108129804	<i>ATM</i>	Região codificante	100%
chr11	108183136	108183227	<i>ATM</i>	Região codificante	100%
chr11	108178622	108178713	<i>ATM</i>	Região codificante	100%
chr11	108218004	108218094	<i>ATM</i>	Região codificante	100%
chr11	108204611	108204697	<i>ATM</i>	Região codificante	100%
chr11	108225536	108225603	<i>ATM</i>	Região codificante	100%
chr11	533764	534324	<i>HRAS</i>		100%
chr12	12870772	12871250	<i>CDKN1B</i>	Éxon 1	100%
chr12	121426634	121426837	<i>HNF1A</i>	Região codificante	100%
chr12	121434063	121434547	<i>HNF1A</i>	Região codificante	100%

chr12	121437069	121437432	<i>HNF1A</i>	Região codificante	100%
chr12	121416570	121416899	<i>HNF1A</i>	Região codificante	100%
chr12	121431965	121432210	<i>HNF1A</i>	Região codificante	100%
chr12	121435275	121435470	<i>HNF1A</i>	Região codificante	100%
chr12	121431321	121431511	<i>HNF1A</i>	Região codificante	100%
chr12	121438866	121438994	<i>HNF1A</i>	Região codificante	100%
chr12	49424061	49428720	<i>KMT2D</i>	Região codificante	94%
chr12	49430906	49438750	<i>KMT2D</i>	Região codificante	100%
chr12	49443463	49447426	<i>KMT2D</i>	Região codificante	100%
chr12	49447759	49449109	<i>KMT2D</i>	Região codificante	100%
chr12	49419963	49421107	<i>KMT2D</i>	Região codificante	100%
chr12	49415564	49416660	<i>KMT2D</i>	Região codificante	100%
chr12	49439701	49440575	<i>KMT2D</i>	Região codificante	100%
chr12	49422609	49423261	<i>KMT2D</i>	Região codificante	100%
chr12	49418359	49418731	<i>KMT2D</i>	Região codificante	100%
chr12	49421584	49421926	<i>KMT2D</i>	Região codificante	100%
chr12	49442886	49443003	<i>KMT2D</i>	Região codificante	100%
chr12	49442440	49442554	<i>KMT2D</i>	Região codificante	100%
chr12	49441746	49441854	<i>KMT2D</i>	Região codificante	100%
chr12	25380166	25380348	<i>KRAS</i>	Éxon 3	100%
chr12	25378546	25378709	<i>KRAS</i>	Éxon 4	100%
chr12	25398206	25398320	<i>KRAS</i>	Éxon 20	100%
chr12	124846670	124846845	<i>NCOR2</i>	Região codificante	99%
chr12	124824550	124825299	<i>NCOR2</i>	Região codificante	100%
chr12	124856566	124857158	<i>NCOR2</i>	Região codificante	100%
chr12	124819679	124820180	<i>NCOR2</i>	Região codificante	100%
chr12	124832369	124832862	<i>NCOR2</i>	Região codificante	100%
chr12	124839022	124839487	<i>NCOR2</i>	Região codificante	100%
chr12	124821297	124821728	<i>NCOR2</i>	Região codificante	100%
chr12	124829141	124829499	<i>NCOR2</i>	Região codificante	100%
chr12	124831108	124831398	<i>NCOR2</i>	Região codificante	100%
chr12	124826367	124826622	<i>NCOR2</i>	Região codificante	100%
chr12	124811953	124812181	<i>NCOR2</i>	Região codificante	100%
chr12	124827549	124827774	<i>NCOR2</i>	Região codificante	100%
chr12	124818968	124819165	<i>NCOR2</i>	Região codificante	100%
chr12	124957496	124957679	<i>NCOR2</i>	Região codificante	100%
chr12	124810735	124810918	<i>NCOR2</i>	Região codificante	100%
chr12	124911166	124911348	<i>NCOR2</i>	Região codificante	100%
chr12	124809949	124810131	<i>NCOR2</i>	Região codificante	100%
chr12	124968140	124968321	<i>NCOR2</i>	Região codificante	100%
chr12	124915159	124915335	<i>NCOR2</i>	Região codificante	100%
chr12	124885045	124885221	<i>NCOR2</i>	Região codificante	100%
chr12	124886948	124887109	<i>NCOR2</i>	Região codificante	100%
chr12	124835131	124835285	<i>NCOR2</i>	Região codificante	100%
chr12	124817674	124817827	<i>NCOR2</i>	Região codificante	100%
chr12	124816863	124817015	<i>NCOR2</i>	Região codificante	100%

chr12	124862781	124862932	NCOR2	Região codificante	100%
chr12	124870289	124870435	NCOR2	Região codificante	100%
chr12	124841186	124841330	NCOR2	Região codificante	100%
chr12	124839976	124840119	NCOR2	Região codificante	100%
chr12	124970985	124971116	NCOR2	Região codificante	100%
chr12	124848223	124848347	NCOR2	Região codificante	100%
chr12	124950717	124950834	NCOR2	Região codificante	100%
chr12	124979691	124979799	NCOR2	Região codificante	100%
chr12	124838637	124838744	NCOR2	Região codificante	100%
chr12	124904501	124904603	NCOR2	Região codificante	100%
chr12	124914157	124914254	NCOR2	Região codificante	100%
chr12	124922474	124922544	NCOR2	Região codificante	100%
chr12	124882663	124882729	NCOR2	Região codificante	100%
chr12	124941650	124941710	NCOR2	Região codificante	100%
chr12	124907045	124907103	NCOR2	Região codificante	100%
chr12	124815389	124815446	NCOR2	Região codificante	100%
chr12	124934359	124934415	NCOR2	Região codificante	100%
chr12	124858957	124859011	NCOR2	Região codificante	100%
chr13	32918693	32918792	BRCA2	Região codificante	0%
chr13	32944537	32944696	BRCA2	Região codificante	77%
chr13	32910400	32915335	BRCA2	Região codificante	98%
chr13	32906407	32907526	BRCA2	Região codificante	100%
chr13	32953452	32954284	BRCA2	Região codificante	100%
chr13	32972297	32972906	BRCA2	Região codificante	100%
chr13	32900236	32900752	BRCA2	Região codificante	100%
chr13	32928996	32929427	BRCA2	Região codificante	100%
chr13	32937314	32937672	BRCA2	Região codificante	100%
chr13	32893212	32893464	BRCA2	Região codificante	100%
chr13	32968824	32969072	BRCA2	Região codificante	100%
chr13	32931877	32932068	BRCA2	Região codificante	100%
chr13	32930563	32930748	BRCA2	Região codificante	100%
chr13	32936658	32936832	BRCA2	Região codificante	100%
chr13	32971033	32971183	BRCA2	Região codificante	100%
chr13	32945091	32945239	BRCA2	Região codificante	100%
chr13	32950805	32950930	BRCA2	Região codificante	100%
chr13	32905054	32905169	BRCA2	Região codificante	100%
chr13	32899211	32899323	BRCA2	Região codificante	100%
chr13	32920962	32921035	BRCA2	Região codificante	100%
chr13	32890596	32890666	BRCA2	Região codificante	100%
chr13	32903578	32903631	BRCA2	Região codificante	100%
chr13	94482405	94482800	GPC6	Região codificante	100%
chr13	95055267	95055470	GPC6	Região codificante	100%
chr13	95050718	95050897	GPC6	Região codificante	100%
chr13	94679981	94680150	GPC6	Região codificante	100%
chr13	93879708	93879871	GPC6	Região codificante	100%
chr13	94197514	94197676	GPC6	Região codificante	100%

chr13	94958232	94958379	<i>GPC6</i>	Região codificante	100%
chr13	95034666	95034806	<i>GPC6</i>	Região codificante	100%
chr13	94938601	94938735	<i>GPC6</i>	Região codificante	100%
chr13	49033822	49033971	<i>RB1</i>	Região codificante	50%
chr13	49039132	49039506	<i>RB1</i>	Região codificante	100%
chr13	48955381	48955581	<i>RB1</i>	Região codificante	100%
chr13	48954187	48954379	<i>RB1</i>	Região codificante	100%
chr13	49030338	49030487	<i>RB1</i>	Região codificante	100%
chr13	49050835	49050981	<i>RB1</i>	Região codificante	100%
chr13	48936949	48937095	<i>RB1</i>	Região codificante	100%
chr13	48878047	48878187	<i>RB1</i>	Região codificante	100%
chr13	48881414	48881544	<i>RB1</i>	Região codificante	100%
chr13	48919214	48919337	<i>RB1</i>	Região codificante	100%
chr13	49027127	49027249	<i>RB1</i>	Região codificante	100%
chr13	48951052	48951172	<i>RB1</i>	Região codificante	100%
chr13	48916733	48916852	<i>RB1</i>	Região codificante	100%
chr13	48934151	48934265	<i>RB1</i>	Região codificante	100%
chr13	48941628	48941741	<i>RB1</i>	Região codificante	100%
chr13	49037865	49037973	<i>RB1</i>	Região codificante	100%
chr13	48947539	48947630	<i>RB1</i>	Região codificante	100%
chr13	48942661	48942742	<i>RB1</i>	Região codificante	100%
chr13	48939028	48939109	<i>RB1</i>	Região codificante	100%
chr13	49054132	49054206	<i>RB1</i>	Região codificante	100%
chr13	48923090	48923161	<i>RB1</i>	Região codificante	100%
chr13	48953728	48953788	<i>RB1</i>	Região codificante	100%
chr13	49051489	49051542	<i>RB1</i>	Região codificante	100%
chr13	48921959	48922001	<i>RB1</i>	Região codificante	100%
chr13	49047494	49047528	<i>RB1</i>	Região codificante	100%
chr14	105242994	105243109	<i>AKT1</i>	Éxon 4	100%
chr14	38060571	38061918	<i>FOXA1</i>	Região codificante	100%
chr14	38064104	38064179	<i>FOXA1</i>	Região codificante	100%
chr15	90628046	90628621	<i>IDH2</i>	Região codificante	100%
chr15	90630342	90630809	<i>IDH2</i>	Região codificante	100%
chr15	90631589	90631981	<i>IDH2</i>	Região codificante	100%
chr15	90633709	90633878	<i>IDH2</i>	Região codificante	100%
chr15	90645506	90645624	<i>IDH2</i>	Região codificante	100%
chr15	90634783	90634878	<i>IDH2</i>	Região codificante	100%
chr15	90627499	90627587	<i>IDH2</i>	Região codificante	100%
chr15	66727363	66727577	<i>MAP2K1</i>	Região codificante	100%
chr15	66777326	66777531	<i>MAP2K1</i>	Região codificante	100%
chr15	66729082	66729232	<i>MAP2K1</i>	Região codificante	100%
chr15	66774091	66774219	<i>MAP2K1</i>	Região codificante	100%
chr15	66782838	66782952	<i>MAP2K1</i>	Região codificante	100%
chr15	66679684	66679767	<i>MAP2K1</i>	Região codificante	100%
chr15	66735616	66735697	<i>MAP2K1</i>	Região codificante	100%
chr15	66779564	66779632	<i>MAP2K1</i>	Região codificante	100%

chr15	66781551	66781616	MAP2K1	Região codificante	100%
chr15	66736992	66737047	MAP2K1	Região codificante	100%
chr15	66782054	66782103	MAP2K1	Região codificante	100%
chr15	67938567	67938809	MAP2K5	Região codificante	100%
chr15	67835672	67835810	MAP2K5	Região codificante	100%
chr15	68098982	68099087	MAP2K5	Região codificante	100%
chr15	67984815	67984892	MAP2K5	Região codificante	100%
chr15	67995673	67995748	MAP2K5	Região codificante	100%
chr15	67873090	67873163	MAP2K5	Região codificante	100%
chr15	67879182	67879253	MAP2K5	Região codificante	100%
chr15	67855619	67855690	MAP2K5	Região codificante	100%
chr15	67893021	67893089	MAP2K5	Região codificante	100%
chr15	68061938	68062003	MAP2K5	Região codificante	100%
chr15	67950889	67950954	MAP2K5	Região codificante	100%
chr15	67985854	67985908	MAP2K5	Região codificante	100%
chr15	67956933	67956985	MAP2K5	Região codificante	100%
chr15	67885262	67885314	MAP2K5	Região codificante	100%
chr15	67842370	67842422	MAP2K5	Região codificante	100%
chr15	68065043	68065092	MAP2K5	Região codificante	100%
chr15	67878226	67878270	MAP2K5	Região codificante	100%
chr15	67923224	67923267	MAP2K5	Região codificante	100%
chr15	68040905	68040941	MAP2K5	Região codificante	100%
chr15	68020252	68020285	MAP2K5	Região codificante	100%
chr15	68040567	68040597	MAP2K5	Região codificante	100%
chr17	41243450	41246879	BRCA1	Região codificante	100%
chr17	41222943	41223257	BRCA1	Região codificante	100%
chr17	41226346	41226540	BRCA1	Região codificante	100%
chr17	41234419	41234594	BRCA1	Região codificante	100%
chr17	41256137	41256280	BRCA1	Região codificante	100%
chr17	41228503	41228630	BRCA1	Região codificante	100%
chr17	41197696	41197821	BRCA1	Região codificante	100%
chr17	41251790	41251899	BRCA1	Região codificante	100%
chr17	41256883	41256975	BRCA1	Região codificante	100%
chr17	41242959	41243051	BRCA1	Região codificante	100%
chr17	41219623	41219714	BRCA1	Região codificante	100%
chr17	41209067	41209154	BRCA1	Região codificante	100%
chr17	41276032	41276115	BRCA1	Região codificante	100%
chr17	41258471	41258552	BRCA1	Região codificante	100%
chr17	41215889	41215970	BRCA1	Região codificante	100%
chr17	41247861	41247941	BRCA1	Região codificante	100%
chr17	41201136	41201213	BRCA1	Região codificante	100%
chr17	41231349	41231418	BRCA1	Região codificante	100%
chr17	41199658	41199722	BRCA1	Região codificante	100%
chr17	41203078	41203136	BRCA1	Região codificante	100%
chr17	41267741	41267798	BRCA1	Região codificante	100%
chr17	41249259	41249308	BRCA1	Região codificante	100%

chr17	41215348	41215392	<i>BRCA1</i>	Região codificante	100%
chr17	37883546	37884296	<i>ERBB2</i>	Região codificante	100%
chr17	37879570	37880265	<i>ERBB2</i>	Região codificante	100%
chr17	37880977	37881657	<i>ERBB2</i>	Região codificante	100%
chr17	37866064	37866736	<i>ERBB2</i>	Região codificante	100%
chr17	37871537	37872194	<i>ERBB2</i>	Região codificante	100%
chr17	37868179	37868703	<i>ERBB2</i>	Região codificante	100%
chr17	37882813	37883258	<i>ERBB2</i>	Região codificante	100%
chr17	37872552	37872860	<i>ERBB2</i>	Região codificante	100%
chr17	37864572	37864789	<i>ERBB2</i>	Região codificante	100%
chr17	37873571	37873735	<i>ERBB2</i>	Região codificante	100%
chr17	37863241	37863396	<i>ERBB2</i>	Região codificante	100%
chr17	37881958	37882108	<i>ERBB2</i>	Região codificante	100%
chr17	37865569	37865707	<i>ERBB2</i>	Região codificante	100%
chr17	37876038	37876089	<i>ERBB2</i>	Região codificante	100%
chr17	47696341	47696749	<i>SPOP</i>	Região codificante	100%
chr17	47688640	47688821	<i>SPOP</i>	Região codificante	100%
chr17	47679225	47679371	<i>SPOP</i>	Região codificante	100%
chr17	47677741	47677886	<i>SPOP</i>	Região codificante	100%
chr17	47684610	47684736	<i>SPOP</i>	Região codificante	100%
chr17	47699306	47699431	<i>SPOP</i>	Região codificante	100%
chr17	47700093	47700174	<i>SPOP</i>	Região codificante	100%
chr17	47685234	47685293	<i>SPOP</i>	Região codificante	100%
chr17	7579310	7579914	<i>TP53</i>	Região codificante	100%
chr17	7578175	7578556	<i>TP53</i>	Região codificante	100%
chr17	7576851	7577157	<i>TP53</i>	Região codificante	100%
chr17	7577497	7577610	<i>TP53</i>	Região codificante	100%
chr17	7573925	7574035	<i>TP53</i>	Região codificante	100%
chr17	7572928	7573010	<i>TP53</i>	Região codificante	100%
chr2	209108149	209108330	<i>IDH1</i>	Éxon 6	99%
chr2	47637231	47637513	<i>MSH2</i>	Região codificante	100%
chr2	47705409	47705660	<i>MSH2</i>	Região codificante	100%
chr2	47702162	47702411	<i>MSH2</i>	Região codificante	100%
chr2	47630329	47630543	<i>MSH2</i>	Região codificante	100%
chr2	47703504	47703712	<i>MSH2</i>	Região codificante	100%
chr2	47656879	47657082	<i>MSH2</i>	Região codificante	100%
chr2	47707833	47708012	<i>MSH2</i>	Região codificante	100%
chr2	47709916	47710087	<i>MSH2</i>	Região codificante	100%
chr2	47635538	47635696	<i>MSH2</i>	Região codificante	100%
chr2	47693795	47693949	<i>MSH2</i>	Região codificante	100%
chr2	47641406	47641559	<i>MSH2</i>	Região codificante	100%
chr2	47639551	47639701	<i>MSH2</i>	Região codificante	100%
chr2	47643433	47643570	<i>MSH2</i>	Região codificante	100%
chr2	47690168	47690295	<i>MSH2</i>	Região codificante	100%
chr2	47672685	47672798	<i>MSH2</i>	Região codificante	100%
chr2	47698102	47698203	<i>MSH2</i>	Região codificante	100%

chr2	48025748	48028296	<i>MSH6</i>	Região codificante	100%
chr2	48033341	48033998	<i>MSH6</i>	Região codificante	100%
chr2	48030557	48030826	<i>MSH6</i>	Região codificante	100%
chr2	48010371	48010634	<i>MSH6</i>	Região codificante	100%
chr2	48018064	48018264	<i>MSH6</i>	Região codificante	100%
chr2	48023031	48023204	<i>MSH6</i>	Região codificante	100%
chr2	48032047	48032168	<i>MSH6</i>	Região codificante	100%
chr2	48032755	48032848	<i>MSH6</i>	Região codificante	100%
chr20	31022233	31025140	<i>ASXL1</i>	Região codificante	100%
chr20	31021085	31021722	<i>ASXL1</i>	Região codificante	100%
chr20	31019122	31019484	<i>ASXL1</i>	Região codificante	100%
chr20	31015929	31016227	<i>ASXL1</i>	Região codificante	100%
chr20	31017702	31017858	<i>ASXL1</i>	Região codificante	100%
chr20	30956813	30956928	<i>ASXL1</i>	Região codificante	100%
chr20	31020681	31020790	<i>ASXL1</i>	Região codificante	100%
chr20	31017139	31017236	<i>ASXL1</i>	Região codificante	100%
chr20	30954185	30954271	<i>ASXL1</i>	Região codificante	100%
chr20	30946577	30946637	<i>ASXL1</i>	Região codificante	100%
chr20	57428506	57430390	<i>GNAS</i>	Éxon 1	100%
chr3	41266015	41266246	<i>CTNNB1</i>	Éxon 3	100%
chr3	37067126	37067500	<i>MLH1</i>	Região codificante	100%
chr3	37053309	37053592	<i>MLH1</i>	Região codificante	100%
chr3	37091975	37092143	<i>MLH1</i>	Região codificante	100%
chr3	37089008	37089176	<i>MLH1</i>	Região codificante	100%
chr3	37061799	37061956	<i>MLH1</i>	Região codificante	100%
chr3	37070273	37070425	<i>MLH1</i>	Região codificante	100%
chr3	37035037	37035156	<i>MLH1</i>	Região codificante	100%
chr3	37090393	37090510	<i>MLH1</i>	Região codificante	100%
chr3	37055921	37056037	<i>MLH1</i>	Região codificante	100%
chr3	37081675	37081787	<i>MLH1</i>	Região codificante	100%
chr3	37042444	37042546	<i>MLH1</i>	Região codificante	100%
chr3	37058995	37059092	<i>MLH1</i>	Região codificante	100%
chr3	37090006	37090102	<i>MLH1</i>	Região codificante	100%
chr3	37050303	37050398	<i>MLH1</i>	Região codificante	100%
chr3	37038108	37038202	<i>MLH1</i>	Região codificante	100%
chr3	37045890	37045967	<i>MLH1</i>	Região codificante	100%
chr3	37048480	37048556	<i>MLH1</i>	Região codificante	100%
chr3	37083757	37083824	<i>MLH1</i>	Região codificante	100%
chr3	178916612	178916967	<i>PIK3CA</i>	Éxon 2	100%
chr3	178951880	178952151	<i>PIK3CA</i>	Éxon 21	100%
chr3	178921330	178921579	<i>PIK3CA</i>	Éxon 5	100%
chr3	178938772	178938947	<i>PIK3CA</i>	Éxon 14	100%
chr3	178927972	178928128	<i>PIK3CA</i>	Éxon 8	100%
chr3	178935996	178936124	<i>PIK3CA</i>	Éxon 10	100%
chr3	178947790	178947911	<i>PIK3CA</i>	Éxon 19	100%
chr3	178927381	178927490	<i>PIK3CA</i>	Éxon 7	100%

chr3	178957785	178957854	<i>PIK3CA</i>	Éxon 21	100%
chr3	48456206	48457862	<i>PLXNB1</i>	Região codificante	100%
chr3	48460324	48461668	<i>PLXNB1</i>	Região codificante	100%
chr3	48453270	48454580	<i>PLXNB1</i>	Região codificante	100%
chr3	48450735	48451969	<i>PLXNB1</i>	Região codificante	100%
chr3	48464912	48466022	<i>PLXNB1</i>	Região codificante	100%
chr3	48462072	48462795	<i>PLXNB1</i>	Região codificante	100%
chr3	48459318	48459953	<i>PLXNB1</i>	Região codificante	100%
chr3	48455077	48455482	<i>PLXNB1</i>	Região codificante	100%
chr3	48463512	48463870	<i>PLXNB1</i>	Região codificante	100%
chr3	48448228	48448500	<i>PLXNB1</i>	Região codificante	100%
chr3	48464172	48464358	<i>PLXNB1</i>	Região codificante	100%
chr3	48452275	48452447	<i>PLXNB1</i>	Região codificante	100%
chr3	48463081	48463217	<i>PLXNB1</i>	Região codificante	100%
chr3	48445894	48445999	<i>PLXNB1</i>	Região codificante	100%
chr3	48447129	48447207	<i>PLXNB1</i>	Região codificante	100%
chr3	172224283	172224711	<i>TNFSF10</i>	Região codificante	100%
chr3	172232649	172232790	<i>TNFSF10</i>	Região codificante	100%
chr3	172241041	172241176	<i>TNFSF10</i>	Região codificante	100%
chr3	172227005	172227113	<i>TNFSF10</i>	Região codificante	100%
chr3	172229405	172229451	<i>TNFSF10</i>	Região codificante	100%
chr3	10183530	10183873	<i>VHL</i>	Região codificante	100%
chr3	10191469	10191648	<i>VHL</i>	Região codificante	100%
chr3	10188196	10188322	<i>VHL</i>	Região codificante	100%
chr4	153332453	153332957	<i>FBXW7</i>	Região codificante	100%
chr4	153244034	153244303	<i>FBXW7</i>	Região codificante	100%
chr4	153247156	153247385	<i>FBXW7</i>	Região codificante	100%
chr4	153245334	153245548	<i>FBXW7</i>	Região codificante	100%
chr4	153249358	153249543	<i>FBXW7</i>	Região codificante	100%
chr4	153268080	153268225	<i>FBXW7</i>	Região codificante	100%
chr4	153251882	153252022	<i>FBXW7</i>	Região codificante	100%
chr4	153258952	153259090	<i>FBXW7</i>	Região codificante	100%
chr4	153253746	153253873	<i>FBXW7</i>	Região codificante	100%
chr4	153250822	153250939	<i>FBXW7</i>	Região codificante	100%
chr4	153271192	153271278	<i>FBXW7</i>	Região codificante	100%
chr4	1803560	1803754	<i>FGFR3</i>	Éxon 7	100%
chr4	1806549	1806698	<i>FGFR3</i>	Éxon 10	100%
chr4	1807982	1808056	<i>FGFR3</i>	Éxon 15	100%
chr4	55955539	55956247	<i>KDR</i>	Região codificante	100%
chr4	55981039	55981580	<i>KDR</i>	Região codificante	100%
chr4	55976568	55976937	<i>KDR</i>	Região codificante	100%
chr4	55970808	55971153	<i>KDR</i>	Região codificante	100%
chr4	55946109	55946332	<i>KDR</i>	Região codificante	100%
chr4	55984769	55984969	<i>KDR</i>	Região codificante	100%
chr4	55979469	55979650	<i>KDR</i>	Região codificante	100%
chr4	55973902	55974062	<i>KDR</i>	Região codificante	100%



chr4	55960967	55961124	<i>KDR</i>	Região codificante	100%
chr4	55953772	55953927	<i>KDR</i>	Região codificante	100%
chr4	55968527	55968677	<i>KDR</i>	Região codificante	100%
chr4	55980291	55980434	<i>KDR</i>	Região codificante	100%
chr4	55964302	55964441	<i>KDR</i>	Região codificante	100%
chr4	55968062	55968197	<i>KDR</i>	Região codificante	100%
chr4	55972852	55972979	<i>KDR</i>	Região codificante	100%
chr4	55962394	55962511	<i>KDR</i>	Região codificante	100%
chr4	55971997	55972109	<i>KDR</i>	Região codificante	100%
chr4	55964862	55964972	<i>KDR</i>	Região codificante	100%
chr4	55955033	55955142	<i>KDR</i>	Região codificante	100%
chr4	55963827	55963935	<i>KDR</i>	Região codificante	100%
chr4	55948701	55948804	<i>KDR</i>	Região codificante	100%
chr4	55958782	55958883	<i>KDR</i>	Região codificante	100%
chr4	55987262	55987359	<i>KDR</i>	Região codificante	100%
chr4	55961742	55961834	<i>KDR</i>	Região codificante	100%
chr4	55948121	55948210	<i>KDR</i>	Região codificante	100%
chr4	55991392	55991462	<i>KDR</i>	Região codificante	100%
chr4	55593382	55593710	<i>KIT</i>	Entre éxon 10 e 11	100%
chr4	55561676	55561949	<i>KIT</i>	Éxon 20	100%
chr4	55592021	55592218	<i>KIT</i>	Éxon 9	100%
chr4	55595499	55595653	<i>KIT</i>	Éxon 14	100%
chr4	55599234	55599360	<i>KIT</i>	Éxon 17	100%
chr4	55602662	55602777	<i>KIT</i>	Éxon 18	100%
chr4	55594175	55594289	<i>KIT</i>	Éxon 13	100%
chr4	55597492	55597587	<i>KIT</i>	Éxon 15	100%
chr4	55144529	55144682	<i>PDGFRA</i>	Éxon 15	100%
chr4	55141008	55141140	<i>PDGFRA</i>	Éxon 12	100%
chr4	55152008	55152130	<i>PDGFRA</i>	Éxon 18	100%
chr4	55144063	55144173	<i>PDGFRA</i>	Éxon 14	100%
chr5	98235182	98235411	<i>CHD1</i>	Região codificante	42%
chr5	98236513	98237041	<i>CHD1</i>	Região codificante	100%
chr5	98233958	98234470	<i>CHD1</i>	Região codificante	100%
chr5	98207753	98208261	<i>CHD1</i>	Região codificante	100%
chr5	98192085	98192431	<i>CHD1</i>	Região codificante	100%
chr5	98216778	98217081	<i>CHD1</i>	Região codificante	100%
chr5	98231928	98232148	<i>CHD1</i>	Região codificante	100%
chr5	98193882	98194096	<i>CHD1</i>	Região codificante	100%
chr5	98240599	98240804	<i>CHD1</i>	Região codificante	100%
chr5	98229118	98229312	<i>CHD1</i>	Região codificante	100%
chr5	98228227	98228419	<i>CHD1</i>	Região codificante	100%
chr5	98199110	98199292	<i>CHD1</i>	Região codificante	100%
chr5	98215254	98215434	<i>CHD1</i>	Região codificante	100%
chr5	98224778	98224944	<i>CHD1</i>	Região codificante	100%
chr5	98212100	98212264	<i>CHD1</i>	Região codificante	100%
chr5	98223790	98223946	<i>CHD1</i>	Região codificante	100%

chr5	98218790	98218943	<i>CHD1</i>	Região codificante	100%
chr5	98217677	98217829	<i>CHD1</i>	Região codificante	100%
chr5	98204197	98204341	<i>CHD1</i>	Região codificante	100%
chr5	98209295	98209429	<i>CHD1</i>	Região codificante	100%
chr5	98205456	98205588	<i>CHD1</i>	Região codificante	100%
chr5	98232895	98233026	<i>CHD1</i>	Região codificante	100%
chr5	98239494	98239614	<i>CHD1</i>	Região codificante	100%
chr5	98206389	98206509	<i>CHD1</i>	Região codificante	100%
chr5	98195674	98195774	<i>CHD1</i>	Região codificante	100%
chr5	98230299	98230392	<i>CHD1</i>	Região codificante	100%
chr5	98221280	98221355	<i>CHD1</i>	Região codificante	100%
chr5	98238602	98238670	<i>CHD1</i>	Região codificante	100%
chr5	98262036	98262092	<i>CHD1</i>	Região codificante	100%
chr5	98194666	98194721	<i>CHD1</i>	Região codificante	100%
chr5	98210774	98210819	<i>CHD1</i>	Região codificante	100%
chr5	147207583	147207693	<i>SPINK1</i>	Região codificante	100%
chr5	147211084	147211142	<i>SPINK1</i>	Região codificante	100%
chr5	147204225	147204271	<i>SPINK1</i>	Região codificante	100%
chr5	147209160	147209195	<i>SPINK1</i>	Região codificante	100%
chr6	43418278	43419014	<i>DLK2</i>	Região codificante	100%
chr6	43422147	43422565	<i>DLK2</i>	Região codificante	100%
chr6	43419676	43419824	<i>DLK2</i>	Região codificante	100%
chr6	43420741	43420875	<i>DLK2</i>	Região codificante	100%
chr7	140453073	140453195	<i>BRAF</i>	Éxon 15	100%
chr7	140481374	140481495	<i>BRAF</i>	Éxon 11	100%
chr7	55248984	55249173	<i>EGFR</i>	Éxon 20	100%
chr7	55210996	55211183	<i>EGFR</i>	Éxon 3	100%
chr7	55259410	55259569	<i>EGFR</i>	Éxon 21	100%
chr7	55221702	55221847	<i>EGFR</i>	Éxon 7	100%
chr7	55241612	55241738	<i>EGFR</i>	Éxon 18	100%
chr7	55242413	55242515	<i>EGFR</i>	Éxon 19	100%
chr7	148506161	148506484	<i>EZH2</i>	Região codificante	100%
chr7	148514967	148515211	<i>EZH2</i>	Região codificante	100%
chr7	148523544	148523726	<i>EZH2</i>	Região codificante	100%
chr7	148511049	148511231	<i>EZH2</i>	Região codificante	100%
chr7	148514312	148514485	<i>EZH2</i>	Região codificante	100%
chr7	148525830	148525974	<i>EZH2</i>	Região codificante	100%
chr7	148543560	148543692	<i>EZH2</i>	Região codificante	100%
chr7	148512004	148512133	<i>EZH2</i>	Região codificante	100%
chr7	148526818	148526942	<i>EZH2</i>	Região codificante	100%
chr7	148544272	148544392	<i>EZH2</i>	Região codificante	100%
chr7	148529724	148529844	<i>EZH2</i>	Região codificante	100%
chr7	148524254	148524360	<i>EZH2</i>	Região codificante	100%
chr7	148508715	148508814	<i>EZH2</i>	Região codificante	100%
chr7	148513774	148513872	<i>EZH2</i>	Região codificante	100%
chr7	148516686	148516781	<i>EZH2</i>	Região codificante	100%

chr7	148507423	148507508	<i>EZH2</i>	Região codificante	100%
chr7	148504739	148504800	<i>EZH2</i>	Região codificante	100%
chr7	148512596	148512640	<i>EZH2</i>	Região codificante	100%
chr7	116339137	116340340	<i>MET</i>	Éxon 2	100%
chr7	116403102	116403324	<i>MET</i>	Éxon 11	100%
chr7	116423356	116423525	<i>MET</i>	Éxon 19	100%
chr7	116411901	116412045	<i>MET</i>	Éxon14	100%
chr7	116417441	116417525	<i>MET</i>	Éxon 16	100%
chr8	71068204	71069477	<i>NCOA2</i>	Região codificante	100%
chr8	71040666	71041217	<i>NCOA2</i>	Região codificante	100%
chr8	71039046	71039284	<i>NCOA2</i>	Região codificante	100%
chr8	71053417	71053636	<i>NCOA2</i>	Região codificante	100%
chr8	71060506	71060720	<i>NCOA2</i>	Região codificante	100%
chr8	71056875	71057085	<i>NCOA2</i>	Região codificante	100%
chr8	71036117	71036319	<i>NCOA2</i>	Região codificante	100%
chr8	71078799	71078991	<i>NCOA2</i>	Região codificante	100%
chr8	71082435	71082616	<i>NCOA2</i>	Região codificante	100%
chr8	71036921	71037102	<i>NCOA2</i>	Região codificante	100%
chr8	71126136	71126312	<i>NCOA2</i>	Região codificante	100%
chr8	71044070	71044239	<i>NCOA2</i>	Região codificante	100%
chr8	71071738	71071889	<i>NCOA2</i>	Região codificante	100%
chr8	71074944	71075091	<i>NCOA2</i>	Região codificante	100%
chr8	71050436	71050569	<i>NCOA2</i>	Região codificante	100%
chr8	71086989	71087096	<i>NCOA2</i>	Região codificante	100%
chr8	71075698	71075803	<i>NCOA2</i>	Região codificante	100%
chr8	71033535	71033628	<i>NCOA2</i>	Região codificante	100%
chr8	71128893	71128982	<i>NCOA2</i>	Região codificante	100%
chr8	71025868	71025880	<i>NCOA2</i>	Região codificante	100%
chr8	99786965	99787049	<i>STK3</i>	Região codificante	0%
chr8	99560195	99560391	<i>STK3</i>	Região codificante	100%
chr8	99538968	99539147	<i>STK3</i>	Região codificante	100%
chr8	99718693	99718864	<i>STK3</i>	Região codificante	100%
chr8	99719373	99719541	<i>STK3</i>	Região codificante	100%
chr8	99468071	99468230	<i>STK3</i>	Região codificante	100%
chr8	99608258	99608399	<i>STK3</i>	Região codificante	100%
chr8	99779469	99779601	<i>STK3</i>	Região codificante	100%
chr8	99591890	99592019	<i>STK3</i>	Região codificante	100%
chr8	99761502	99761620	<i>STK3</i>	Região codificante	100%
chr8	99895873	99895986	<i>STK3</i>	Região codificante	100%
chr9	21970899	21971209	<i>CDKN2A</i>	Região codificante	100%
chr9	21974675	21974828	<i>CDKN2A</i>	Região codificante	100%
chr9	21968725	21968772	<i>CDKN2A</i>	Região codificante	100%
chr9	80430530	80430688	<i>GNAQ</i>	Éxon 3	100%
chr9	5073694	5073794	<i>JAK2</i>	Éxon 14	100%
chrX	66918956	66931533	<i>AR</i>	Região codificante	43%
chrX	66905850	66918606	<i>AR</i>	Região codificante	100%

chrX	66764987	66766606	AR	Região codificante	100%
chrX	66942667	66942828	AR	Região codificante	100%
chrX	66943526	66943682	AR	Região codificante	100%
chrX	66863096	66863251	AR	Região codificante	100%
chrX	66937318	66937466	AR	Região codificante	100%
chrX	66941673	66941807	AR	Região codificante	100%
chrX	53223319	53224594	KDM5C	Região codificante	100%
chrX	53222150	53223035	KDM5C	Região codificante	100%
chrX	53227670	53228342	KDM5C	Região codificante	100%
chrX	53239594	53240041	KDM5C	Região codificante	100%
chrX	53230730	53231157	KDM5C	Região codificante	100%
chrX	53240677	53241090	KDM5C	Região codificante	100%
chrX	53244975	53245381	KDM5C	Região codificante	100%
chrX	53225866	53226228	KDM5C	Região codificante	100%
chrX	53246976	53247150	KDM5C	Região codificante	100%
chrX	53243869	53244031	KDM5C	Região codificante	100%
chrX	53253920	53254073	KDM5C	Região codificante	100%
chrX	53225096	53225238	KDM5C	Região codificante	100%
chrX	53246323	53246461	KDM5C	Região codificante	100%
chrX	53247456	53247582	KDM5C	Região codificante	100%
chrX	53226951	53227060	KDM5C	Região codificante	100%
chrX	53250019	53250100	KDM5C	Região codificante	100%
chrX	44941819	44942036	KDM6A	Região codificante	98%
chrX	44928822	44929604	KDM6A	Região codificante	100%
chrX	44918249	44918713	KDM6A	Região codificante	100%
chrX	44732796	44733235	KDM6A	Região codificante	100%
chrX	44922665	44923064	KDM6A	Região codificante	100%
chrX	44938389	44938598	KDM6A	Região codificante	100%
chrX	44948986	44949177	KDM6A	Região codificante	100%
chrX	44969322	44969496	KDM6A	Região codificante	100%
chrX	44942703	44942855	KDM6A	Região codificante	100%
chrX	44949966	44950111	KDM6A	Região codificante	100%
chrX	44919265	44919403	KDM6A	Região codificante	100%
chrX	44935940	44936073	KDM6A	Região codificante	100%
chrX	44966653	44966783	KDM6A	Região codificante	100%
chrX	44913072	44913202	KDM6A	Região codificante	100%
chrX	44879853	44879977	KDM6A	Região codificante	100%
chrX	44945108	44945226	KDM6A	Região codificante	100%
chrX	44820527	44820639	KDM6A	Região codificante	100%
chrX	44937643	44937752	KDM6A	Região codificante	100%
chrX	44921890	44921995	KDM6A	Região codificante	100%
chrX	44920567	44920666	KDM6A	Região codificante	100%
chrX	44910952	44911049	KDM6A	Região codificante	100%
chrX	44870204	44870266	KDM6A	Região codificante	100%
chrX	44894174	44894232	KDM6A	Região codificante	100%
chrX	44833909	44833962	KDM6A	Região codificante	100%

chrX	44896898	44896936	<i>KDM6A</i>	Região codificante	100%
chrX	44970625	44970655	<i>KDM6A</i>	Região codificante	100%
chrX	70356129	70357795	<i>MED12</i>	Região codificante	100%
chrX	70348962	70350066	<i>MED12</i>	Região codificante	100%
chrX	70342048	70343078	<i>MED12</i>	Região codificante	100%
chrX	70344612	70345565	<i>MED12</i>	Região codificante	100%
chrX	70354205	70355105	<i>MED12</i>	Região codificante	100%
chrX	70340819	70341668	<i>MED12</i>	Região codificante	100%
chrX	70347741	70348570	<i>MED12</i>	Região codificante	100%
chrX	70339221	70340022	<i>MED12</i>	Região codificante	100%
chrX	70346817	70347319	<i>MED12</i>	Região codificante	100%
chrX	70351921	70352390	<i>MED12</i>	Região codificante	100%
chrX	70345884	70346336	<i>MED12</i>	Região codificante	100%
chrX	70352693	70353064	<i>MED12</i>	Região codificante	100%
chrX	70361731	70362067	<i>MED12</i>	Região codificante	100%
chrX	70344007	70344240	<i>MED12</i>	Região codificante	100%
chrX	70360483	70360709	<i>MED12</i>	Região codificante	100%
chrX	70361078	70361222	<i>MED12</i>	Região codificante	100%
chrX	70343442	70343572	<i>MED12</i>	Região codificante	100%
chrX	70338603	70338705	<i>MED12</i>	Região codificante	100%
chrX	70351398	70351473	<i>MED12</i>	Região codificante	100%

**Anexo 4 - Tabela com as 292 variantes somáticas selecionadas e suas características.**

ID	Coordenada Genômica	Ref/Alt	Indel/SNV	Gene	NM referência	Efeito	Freq. Variante	HGVS c.	HGVS p.	Polyphen2	Mutation Taster	FATHMM	COSMIC	dbSNP	ExAC	AbraOm
T01	17:41244954	T/C	SNV	<i>BRCA1</i>	NM_007294.3	Mis	0,152	c.2594A>G	p.Lys865Arg	ProD	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T01	X:53225896	C/T	SNV	<i>KDM5C</i>	NM_004187.3	Mis	0,029	c.2953G>A	p.Glu985Lys	ProD	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T01	12:49437757	T/G	SNV	<i>KMT2D</i>	NM_003482.3	Mis	0,027	c.5213A>C	p.Glu1738Ala	B	To	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T02	11:108218052	G/C	SNV	<i>ATM</i>	NM_000051.3	Mis	0,059	c.8631G>C	p.Leu2877Phe	ProD	D	D	ID:3733255	Ausente	Ausente	Ausente
T02	9:21974664	A/T	SNV	<i>CDKN2A</i>	NM_058195.3	Mis	0,038	c.194-3457T>A		-	-	-	Ausente	Ausente	1,66E-02	Ausente
T02	7:148508739	A/G	SNV	<i>EZH2</i>	NM_004456.4	Mis	0,024	c.1925T>C	p.Phe642Ser	PoD	D	D	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T02	20:57428459	G/A	SNV	<i>GNAS</i>	NM_001077490.1	Mis	0,030	c.-49G>A		PoD	D	D	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T02	12:121431392	G/A	SNV	<i>HNF1A</i>	NM_000545.5	Mis	0,033	c.596G>A	p.Gly199Glu	B	D	D	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T02	X:44970643	C/A	SNV	<i>KDM6A</i>	NM_021140.2	Mis	0,021	c.4193C>A	p.Ser1398Tyr	ProD	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T02	X:44732942	C/T	SNV	<i>KDM6A</i>	NM_021140.2	Mis	0,029	c.145C>T	p.Leu49Phe	ProD	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T02	12:49418630	C/A	SNV	<i>KMT2D</i>	NM_003482.3	Mis	0,024	c.15884G>T	p.Gly5295Val	ProD	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T02	X:70344083	G/A	SNV	<i>MED12</i>	NM_005120.2	Mis	0,030	c.1819G>A	p.Asp607Asn	ProD	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T02	X:70344066	G/A	SNV	<i>MED12</i>	NM_005120.2	Mis	0,035	c.1802G>A	p.Cys601Tyr	B	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T02	3:37053568	A/G	SNV	<i>MLH1</i>	NM_001258271.1	Mis	0,999	c.655A>G	p.Ile219Val	B	D	D	ID: 1131469	rs1799977	0.2325	Ausente
T02	2:48025764	C/T	SNV	<i>MSH6</i>	NM_001281492.1	Mis	0,376	c.252C>T	p.=	-	-	-	Ausente	rs1800937	0.0735	0,064039
T02	1:11319482	T/C	SNV	<i>MTOR</i>	NM_004958.3	LoF	0,028	c.-14-2A>G		-	-	-	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T02	1:11184639	C/T	SNV	<i>MTOR</i>	NM_004958.3	Mis	0,034	c.6578G>A	p.Arg2193His	ProD	D	D	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T02	12:124819725	C/T	SNV	<i>NCOR2</i>	NM_006312.5	Mis	0,037	c.6367G>A	p.Val2123Ile	B	To	To	Ausente	Ausente	8,54E-03	Ausente

T02	3:178927410	A/G	SNV	<i>PIK3CA</i>	NM_006218.2	Mis	0,450	c.1173A>G	p.Ile391Met	B	D	To	ID: 328028	rs2230461	0,06488	Ausente
T02	3:48453316	T/A	SNV	<i>PLXNB1</i>	NM_002673.4	Mis	0,036	c.5203A>T	p.Asn1735Tyr	ProD	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T03	14:38061138	C/-	INDEL	<i>FOXA1</i>	NM_004496.3	LoF	0,034	c.851delG	p.Gly284fs	-	-	-	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T04	X:66941760	C/A	SNV	<i>AR</i>	NM_000044.3	Mis	0,060	c.2404C>A	p.Pro802Thr	PoD	D	D	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T04	20:31023421	A/C	SNV	<i>ASXL1</i>	NM_015338.5	Mis	0,022	c.2906A>C	p.Asp969Ala	B	To	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T04	20:31016045	A/G	SNV	<i>ASXL1</i>	NM_015338.5	Mis	0,024	c.367A>G	p.Asn123Asp	ProD	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T04	20:30956847	C/T	SNV	<i>ASXL1</i>	NM_015338.5	Mis	0,028	c.173C>T	p.Ala58Val	ProD	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T04	20:31024896	C/-	INDEL	<i>ASXL1</i>	NM_015338.5	LoF	0,034	c.4381delC	p.Thr1462fs	-	-	-	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T04	11:108139193	G/A	SNV	<i>ATM</i>	NM_000051.3	Mis	0,029	c.2695G>A	p.Asp899Asn	B	To	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T04	11:108150277	T/C	SNV	<i>ATM</i>	NM_000051.3	Mis	0,035	c.3344T>C	p.Leu1115Pro	PoD	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T04	11:108173592	C/T	SNV	<i>ATM</i>	NM_000051.3	Mis	0,042	c.5332C>T	p.Pro1778Ser	B	To	D	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T04	11:108159774	A/G	SNV	<i>ATM</i>	NM_000051.3	Mis	0,046	c.4180A>G	p.Ser1394Gly	ProD	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T04	17:41243992	G/A	SNV	<i>BRCA1</i>	NM_007294.3	Mis	0,024	c.3556C>T	p.Leu1186Phe	B	To	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T04	17:41246380	C/-	INDEL	<i>BRCA1</i>	NM_007294.3	LoF	0,030	c.1168delG	p.Asp390fs	-	-	-	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T04	17:41244508	T/-	INDEL	<i>BRCA1</i>	NM_007294.3	LoF	0,030	c.3040delA	p.Met1014fs	-	-	-	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T04	13:32910723	C/T	SNV	<i>BRCA2</i>	NM_000059.3	Mis	0,022	c.2231C>T	p.Ser744Leu	B	To	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T04	13:32900683	G/-	INDEL	<i>BRCA2</i>	NM_000059.3	LoF	0,023	c.564delG	p.Asp189fs	-	-	-	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T04	13:32910758	C/A	SNV	<i>BRCA2</i>	NM_000059.3	Mis	0,025	c.2266C>A	p.Gln756Lys	B	To	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T04	13:32914991	T/-	INDEL	<i>BRCA2</i>	NM_000059.3	LoF	0,041	c.6499delT	p.Leu2167Ter	-	-	-	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T04	9:21968744	A/G	SNV	<i>CDKN2A</i>	NM_058195.3	Mis	0,030	c.*102-503T>C			To	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T04	5:98204261	T/-	INDEL	<i>CHD1</i>	NM_001270.2	LoF	0,021	c.4186delA	p.Ser1396fs	-	-	-	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T04	5:98195746	A/G	SNV	<i>CHD1</i>	NM_001270.2	Mis	0,022	c.4454T>C	p.Phe1485Ser	ProD	D	D	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

T04	1:6172251	T/C	SNV	<i>CHD5</i>	NM_015557.2	Mis	0,033	c.5089A>G	p.Lys1697Glu	B	D	D	Ausente	Ausente	8,24E-03	Ausente
T04	1:6194193	A/G	SNV	<i>CHD5</i>	NM_015557.2	Mis	0,045	c.3139T>C	p.Ser1047Pro	ProD	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T04	7:148543624	G/T	SNV	<i>EZH2</i>	NM_004456.4	Mis	0,023	c.184C>A	p.Gln62Lys	B	D	D	ID: 1449041	Ausente	Ausente	Ausente
T04	7:148506176	A/G	SNV	<i>EZH2</i>	NM_004456.4	Mis	0,037	c.2182T>C	p.Phe728Leu	ProD	D	D	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T04	7:148514367	A/T	SNV	<i>EZH2</i>	NM_004456.4	Mis	0,048	c.1357T>A	p.Tyr453Asn	ProD	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T04	4:153251911	C/-	INDEL	<i>FBXW7</i>	NM_033632.3	LoF	0,020	c.1095delG	p.Trp365Ter	-	-	-	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T04	10:123243295	A/G	SNV	<i>FGFR2</i>	NM_023029.2	Mis	0,022	c.1951T>C	p.Trp651Arg	ProD	D	D	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T04	10:123279543	T/C	SNV	<i>FGFR2</i>	NM_023029.2	Mis	0,026	c.622A>G	p.Asn208Asp	ProD	D	D	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T04	10:123274726	A/T	SNV	<i>FGFR2</i>	NM_023029.2	Mis	0,038	c.925T>A	p.Cys309Ser	PoD	D	D	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T04	10:123298104	A/T	SNV	<i>FGFR2</i>	NM_023029.2	LoF	0,049	c.481+2T>A		-	D	-	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T04	4:1803613	C/T	SNV	<i>FGFR3</i>	NM_000142.4	Mis	0,043	c.791C>T	p.Thr264Met	ProD	D	D	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T04	14:38060626	G/-	INDEL	<i>FOXA1</i>	NM_004496.3	LoF	0,021	c.1363delC	p.Leu455fs	-	-	-	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T04	14:38061370	A/G	SNV	<i>FOXA1</i>	NM_004496.3	Mis	0,060	c.619T>C	p.Tyr207His	ProD	D	D	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T04	14:38061108	C/T	SNV	<i>FOXA1</i>	NM_004496.3	Mis	0,210	c.881G>A	p.Arg294His	PoD	D	D	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T04	20:57430272	A/G	SNV	<i>GNAS</i>	NM_001077490.1	Mis	0,033	c.1765A>G	p.Lys589Glu	B	D	D	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T04	12:121431414	G/T	SNV	<i>HNF1A</i>	NM_000545.5	Mis	0,029	c.618G>T	p.Trp206Cys	ProD	D	D	ID: 21478	Ausente	Ausente	Ausente
T04	15:90634832	C/T	SNV	<i>IDH2</i>	NM_002168.2	Mis	0,022	c.160G>A	p.Asp54Asn	ProD	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T04	15:90631865	C/T	SNV	<i>IDH2</i>	NM_002168.2	Mis	0,035	c.488G>A	p.Gly163Asp	ProD	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T04	X:53240792	T/C	SNV	<i>KDM5C</i>	NM_004187.3	Mis	0,023	c.1288A>G	p.Asn430Asp	B	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T04	X:53227693	A/T	SNV	<i>KDM5C</i>	NM_004187.3	Mis	0,045	c.2495T>A	p.Leu832Gln	PoD	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T04	X:53230797	C/T	SNV	<i>KDM5C</i>	NM_004187.3	Mis	0,091	c.1996G>A	p.Val666Met	PoD	D	D	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente



T04	X:44928914	G/A	SNV	<i>KDM6A</i>	NM_021140.2	Mis	0,022	c.2014G>A	p.Ala672Thr	B	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T04	X:44929203	A/G	SNV	<i>KDM6A</i>	NM_021140.2	Mis	0,025	c.2303A>G	p.Lys768Arg	ProD	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T04	X:44942770	A/G	SNV	<i>KDM6A</i>	NM_021140.2	Mis	0,027	c.3350A>G	p.Asn1117Ser	ProD	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T04	X:44733220	C/A	SNV	<i>KDM6A</i>	NM_021140.2	Mis	0,127	c.212C>A	p.Ala71Asp	PoD	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T04	4:55956121	A/T	SNV	<i>KDR</i>	NM_002253.2	LoF	0,022	c.3192+2T>A		-	D	-	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T04	4:55958869	A/G	SNV	<i>KDR</i>	NM_002253.2	Mis	0,022	c.2984T>C	p.Leu995Pro	B	To	D	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T04	4:55964381	A/G	SNV	<i>KDR</i>	NM_002253.2	Mis	0,027	c.2432T>C	p.Leu811Pro	PoD	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T04	4:55948175	A/G	SNV	<i>KDR</i>	NM_002253.2	Mis	0,035	c.3796T>C	p.Ser1266Pro	B	D	To	Ausente	Ausente	8,24E-06	Ausente
T04	4:55981086	T/C	SNV	<i>KDR</i>	NM_002253.2	Mis	0,038	c.613A>G	p.Asn205Asp	B	To	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T04	12:49435315	C/T	SNV	<i>KMT2D</i>	NM_003482.3	Mis	0,031	c.6238G>A	p.Ala2080Thr	ProD	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T04	12:49433777	G/T	SNV	<i>KMT2D</i>	NM_003482.3	Mis	0,038	c.7776C>A	p.Ser2592Arg	PoD	To	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T04	12:49422628	A/G	SNV	<i>KMT2D</i>	NM_003482.3	Mis	0,041	c.14365T>C	p.Ser4789Pro	ProD	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T04	12:49415567	T/C	SNV	<i>KMT2D</i>	NM_003482.3	Mis	0,045	c.16610A>G	p.Asn5537Ser	ProD	D	D	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T04	12:49420682	C/A	SNV	<i>KMT2D</i>	NM_003482.3	Mis	0,050	c.15067G>T	p.Asp5023Tyr	PoD	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T04	15:67878259	T/A	SNV	<i>MAP2K5</i>	NM_002757.3	Mis	0,035	c.354T>A	p.His118Gln	PoD	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T04	X:70356727	A/G	SNV	<i>MED12</i>	NM_005120.2	LoF	0,022	c.5401-2A>G		-	D	-	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T04	X:70355003	C/T	SNV	<i>MED12</i>	NM_005120.2	Mis	0,023	c.4925C>T	p.Pro1642Leu	PoD	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T04	X:70342678	T/C	SNV	<i>MED12</i>	NM_005120.2	Mis	0,024	c.1439T>C	p.Leu480Pro	ProD	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T04	X:70339964	A/G	SNV	<i>MED12</i>	NM_005120.2	Mis	0,025	c.497A>G	p.Tyr166Cys	ProD	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T04	X:70352331	A/G	SNV	<i>MED12</i>	NM_005120.2	Mis	0,029	c.4358A>G	p.Lys1453Arg	PoD	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T04	X:70347771	A/G	SNV	<i>MED12</i>	NM_005120.2	Mis	0,029	c.3010A>G	p.Ile1004Val	B	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T04	X:70344673	C/A	SNV	<i>MED12</i>	NM_005120.2	Mis	0,039	c.2034C>A	p.Asp678Glu	B	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

T04	7:116403290	T/C	SNV	<i>MET</i>	NM_001127500.1	Mis	0,021	c.2605T>C	p.Ser869Pro	PoD	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T04	3:37070349	-/C	INDEL	<i>MLH1</i>	NM_001258271.1	LoF	0,020	c.1483_1484insC	p.Arg497fs	-	-	-	ID: 1685348	Ausente	Ausente	Ausente
T04	3:37090449	A/G	SNV	<i>MLH1</i>	NM_001258271.1	Mis	0,023	c.1896+1275A>G		B	D	D	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T04	2:47702251	C/A	SNV	<i>MSH2</i>	NM_000251.2	Mis	0,031	c.1847C>A	p.Pro616His	ProD	D	D	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T04	2:48033475	T/C	SNV	<i>MSH6</i>	NM_001281492.1	Mis	0,021	c.3389T>C	p.Val1130Ala	B	D	D	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T04	1:11259408	G/T	SNV	<i>MTOR</i>	NM_004958.3	Mis	0,022	c.4160C>A	p.Ala1387Asp	ProD	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T04	1:11269397	A/G	SNV	<i>MTOR</i>	NM_004958.3	Mis	0,023	c.3773T>C	p.Leu1258Pro	ProD	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T04	1:11291362	T/C	SNV	<i>MTOR</i>	NM_004958.3	Mis	0,031	c.2644A>G	p.Arg882Gly	PoD	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T04	8:71075698	A/G	SNV	<i>NCOA2</i>	NM_006540.2	LoF	0,025	c.832+2T>C		-	D	-	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T04	8:71069047	C/T	SNV	<i>NCOA2</i>	NM_006540.2	Mis	0,040	c.1553G>A	p.Gly518Glu	PoD	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T04	12:124829476	T/C	SNV	<i>NCOR2</i>	NM_006312.5	Mis	0,022	c.4381A>G	p.Thr1461Ala	B	To	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T04	12:124839057	C/T	SNV	<i>NCOR2</i>	NM_006312.5	Mis	0,023	c.3556G>A	p.Val1186Met	B	To	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T04	12:124856722	C/T	SNV	<i>NCOR2</i>	NM_006312.5	Mis	0,038	c.2653G>A	p.Ala885Thr	B	To	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T04	12:124915287	T/C	SNV	<i>NCOR2</i>	NM_006312.5	Mis	0,076	c.929A>G	p.Glu310Gly	ProD	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T04	1:115252281	A/T	SNV	<i>NRAS</i>	NM_002524.4	LoF	0,025	c.359T>A	p.Leu120Ter	-	D	-	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T04	3:178921410	C/T	SNV	<i>PIK3CA</i>	NM_006218.2	Mis	0,023	c.892C>T	p.Pro298Ser	B	D	To	ID: 1420777	Ausente	Ausente	Ausente
T04	3:178928286	T/-	INDEL	<i>PIK3CA</i>	NM_006218.2	LoF	0,026	c.1472delT	p.Val491fs	-	-	-	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T04	3:48461008	T/C	SNV	<i>PLXNB1</i>	NM_002673.4	Mis	0,020	c.2687A>G	p.Asp896Gly	PoD	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T04	3:48456449	A/G	SNV	<i>PLXNB1</i>	NM_002673.4	Mis	0,022	c.3968T>C	p.Phe1323Ser	PoD	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T04	3:48456417	G/A	SNV	<i>PLXNB1</i>	NM_002673.4	Mis	0,031	c.4000C>T	p.Leu1334Phe	ProD	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

T04	10:89725051	T/A	SNV	<i>PTEN</i>	NM_000314.4	Mis	0,023	c.1034T>A	p.Leu345Gln	PoD	D	D	ID: 5213	Ausente	Ausente	Ausente
T04	10:89725180	A/G	SNV	<i>PTEN</i>	NM_000314.4	Mis	0,027	c.1163A>G	p.Glu388Gly	ProD	D	D		Ausente	Ausente	Ausente
T04	13:48934216	A/G	SNV	<i>RB1</i>	NM_000321.2	Mis	0,023	c.671A>G	p.Asp224Gly	PoD	D	To		Ausente	Ausente	Ausente
T04	13:49039245	A/G	SNV	<i>RB1</i>	NM_000321.2	Mis	0,029	c.2323A>G	p.Arg775Gly	ProD	D	D		Ausente	Ausente	Ausente
T04	10:43617417	G/-	INDEL	<i>RET</i>	NM_020630.4	LoF	0,036	c.2754delG	p.Ala919fs	-	-	-		Ausente	Ausente	Ausente
T04	3:172241171	C/G	SNV	<i>TNFSF10</i>	NM_003810.3	Mis	0,050	c.4G>C	p.Ala2Pro	B	To	To		Ausente	Ausente	Ausente
T04	17:7578247	A/G	SNV	<i>TP53</i>	NM_001126115.1	Mis	0,039	c.206T>C	p.Leu69Ser	PoD	To	D	ID: 45585	Ausente	Ausente	Ausente
T04	3:10183593	A/G	SNV	<i>VHL</i>	NM_198156.2	Mis	0,023	c.62A>G	p.Glu21Gly	B	To	D		Ausente	Ausente	Ausente
T04	3:10191525	A/G	SNV	<i>VHL</i>	NM_198156.2	Mis	0,025	c.395A>G	p.Glu132Gly	ProD	D	D		Ausente	Ausente	Ausente
T05	20:31022738	T/A	SNV	<i>ASXL1</i>	NM_015338.5	Mis	0,023	c.2223T>A	p.Asp741Glu	B	To	To		Ausente	Ausente	Ausente
T05	1:6166709	C/-	INDEL	<i>CHD5</i>	NM_015557.2	LoF	0,021	c.5709delG	p.Thr1904fs	-	-	-		Ausente	Ausente	Ausente
T05	1:6196590	G/T	SNV	<i>CHD5</i>	NM_015557.2	Mis	0,069	c.2683C>A	p.Pro895Thr	PoD	D	D		Ausente	Ausente	Ausente
T05	20:57429058	C/T	SNV	<i>GNAS</i>	NM_001077490.1	Mis	0,030	c.551C>T	p.Ser184Leu	-	To	-		Ausente	Ausente	Ausente
T05	X:53222958	T/C	SNV	<i>KDM5C</i>	NM_004187.3	Mis	0,021	c.4114A>G	p.Arg1372Gly	B	D	D		Ausente	Ausente	2,33E-05
T05	12:49424071	G/T	SNV	<i>KMT2D</i>	NM_003482.3	Mis	0,022	c.13991C>A	p.Ala4664Glu	B	To	To		Ausente	Ausente	Ausente
T05	12:49420275	C/G	SNV	<i>KMT2D</i>	NM_003482.3	Mis	0,026	c.15474G>C	p.Glu5158Asp	ProD	D	To		Ausente	Ausente	Ausente
T05	12:49446462	G/-	INDEL	<i>KMT2D</i>	NM_003482.3	LoF	0,028	c.1143delC	p.Thr382fs	-	-	-	ID:1731943	Ausente	Ausente	Ausente
T05	8:71036303	T/G	SNV	<i>NCOA2</i>	NM_006540.2	Mis	0,026	c.4109A>C	p.Gln1370Pro	ProD	D	To		Ausente	Ausente	Ausente
T05	12:124870296	T/A	SNV	<i>NCOR2</i>	NM_006312.5	LoF	0,027	c.2014A>T	p.Lys672Ter	-	D	-		Ausente	Ausente	Ausente
T05	3:48457151	G/A	SNV	<i>PLXNB1</i>	NM_002673.4	Mis	0,027	c.3635C>T	p.Ser1212Leu	B	To	To		Ausente	Ausente	Ausente
T05	13:49054143	G/A	SNV	<i>RB1</i>	NM_000321.2	Mis	0,030	c.2723G>A	p.Arg908Gln	ProD	D	D		Ausente	Ausente	Ausente
T06	20:31021560	A/G	SNV	<i>ASXL1</i>	NM_015338.5	Mis	0,029	c.1559A>G	p.Lys520Arg	B	D	To		Ausente	Ausente	Ausente

T06	5:98232915	A/G	SNV	<i>CHD1</i>	NM_001270.2	Mis	0,031	c.1475T>C	p.Leu492Pro	ProD	D	D	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T09	14:38061639	C/-	INDEL	<i>FOXA1</i>	NM_004496.3	LoF	0,043	c.350delG	p.Gly117fs	-	-	-	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T09	12:49428677	C/-	INDEL	<i>KMT2D</i>	NM_003482.3	LoF	0,032	c.10273delG	p.Ala3425fs	-	-	-	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T09	12:49425982	C/G	SNV	<i>KMT2D</i>	NM_003482.3	Mis	0,042	c.12506G>C	p.Gly4169Ala	B	To	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T09	X:70352376	A/-	INDEL	<i>MED12</i>	NM_005120.2	LoF	0,049	c.4403delA	p.Lys1469fs	-	-	-	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T09	12:124821658	C/-	INDEL	<i>NCOR2</i>	NM_006312.5	LoF	0,038	c.5756delG	p.Gly1919fs	-	-	-	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T10	X:66937341	A/G	SNV	<i>AR</i>	NM_000044.3	Mis	0,032	c.2195A>G	p.Asp732Gly	PoD	D	D	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T10	5:98235344	T/C	SNV	<i>CHD1</i>	NM_001270.2	Mis	0,025	c.925A>G	p.Lys309Glu	B	To	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T10	5:98217802	T/-	INDEL	<i>CHD1</i>	NM_001270.2	LoF	0,030	c.2744delA	p.Lys915fs	-	-	-	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T10	12:121432074	A/G	SNV	<i>HNF1A</i>	NM_000545.5	Mis	0,022	c.821A>G	p.Glu274Gly	ProD	D	D	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T10	4:55955585	T/A	SNV	<i>KDR</i>	NM_002253.2	Mis	0,020	c.3360A>T	p.Lys1120Asn	ProD	D	D	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T10	3:48462323	A/G	SNV	<i>PLXNB1</i>	NM_002673.4	Mis	0,023	c.1853T>C	p.Val618Ala	B	To	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T10	3:48463823	T/C	SNV	<i>PLXNB1</i>	NM_002673.4	Mis	0,032	c.1336A>G	p.Ser446Gly	B	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T12	4:55956146	G/C	SNV	<i>KDR</i>	NM_002253.2	Mis	0,027	c.3169C>G	p.Pro1057Ala	ProD	D	D	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T13	17:41228613	T/C	SNV	<i>BRCA1</i>	NM_007294.3	Mis	0,028	c.4376A>G	p.Lys1459Arg				Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T13	1:6181613	C/T	SNV	<i>CHD5</i>	NM_015557.2	Mis	0,043	c.4720G>A	p.Gly1574Ser	-	-	-	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T13	12:121437082	C/T	SNV	<i>HNF1A</i>	NM_000545.5	Mis	0,023	c.1513C>T	p.His505Tyr	-	-	-	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T13	12:49420794	C/-	INDEL	<i>KMT2D</i>	NM_003482.3	LoF	0,033	c.14955delG	p.Arg4986fs	-	-	-	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T14	11:108235923	C/T	SNV	<i>ATM</i>	NM_000051.3	LoF	0,023	c.8965C>T	p.Gln2989Ter	-	D	-	ID:758335	Ausente	Ausente	Ausente
T14	4:153244190	A/G	SNV	<i>FBXW7</i>	NM_033632.3	Mis	0,024	c.1967T>C	p.Phe656Ser	PoD	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T14	12:49420786	T/C	SNV	<i>KMT2D</i>	NM_003482.3	Mis	0,022	c.14963A>G	p.Lys4988Arg	ProD	D	D	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T14	12:49431661	T/C	SNV	<i>KMT2D</i>	NM_003482.3	Mis	0,026	c.9478A>G	p.Met3160Val	B	To	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

T14	15:67835699	T/C	SNV	MAP2K5	NM_002757.3	Mis	0,031	c.26T>C	p.Phe9Ser	B	To	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T15	13:32913740	T/C	SNV	BRCA2	NM_000059.3	Mis	0,020	c.5248T>C	p.Ser1750Pro	B	To	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T15	13:32911502	A/T	SNV	BRCA2	NM_000059.3	Mis	0,037	c.3010A>T	p.Ser1004Cys	B	To	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T15	17:37872776	G/-	INDEL	ERBB2	NM_004448.2	LoF	0,055	c.1655delG	p.Glu553fs	-	-	-	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T15	20:57429965	T/-	INDEL	GNAS	NM_001077490.1	LoF	0,071	c.1458delT	p.Leu487fs	PoD	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T15	X:70357748	A/G	SNV	MED12	NM_005120.2	Mis	0,028	c.5999A>G	p.His2000Arg	PoD	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T15	12:124840006	A/G	SNV	NCOR2	NM_006312.5	Mis	0,033	c.3353T>C	p.Leu1118Pro	ProD	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T16	12:124831130	T/C	SNV	NCOR2	NM_006312.5	Mis	0,029	c.4339A>G	p.Lys1447Glu	ProD	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T17	12:12870937	C/G	SNV	CDKN1B	NM_004064.3	Mis	0,059	c.164C>G	p.Ala55Gly	PoD	To	D	Ausente	Ausente	0,000182	Ausente
T17	4:55953780	C/A	SNV	KDR	NM_002253.2	Mis	0,029	c.3656G>T	p.Gly1219Val	PoD	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T17	X:70342687	G/A	SNV	MED12	NM_005120.2	Mis	0,023	c.1448G>A	p.Arg483Gln	ProD	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T18	17:37879588	A/G	SNV	ERBB2	NM_004448.2	Mis	0,302	c.1963A>G	p.Ile655Val	B	D	To	Presente	Ausente	Ausente	0,144499
T18	12:124856574	T/C	SNV	NCOR2	NM_006312.5	Mis	0,028	c.2801A>G	p.Lys934Arg	ProD	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T19	1:6170010	C/T	SNV	CHD5	NM_015557.2	Mis	0,025	c.5423G>A	p.Arg1808Lys	ProD	D	D	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T19	1:6185856	C/A	SNV	CHD5	NM_015557.2	LoF	0,033	c.4141G>T	p.Glu1381Ter	-	D	-	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T19	4:153244118	G/-	INDEL	FBXW7	NM_033632.3	LoF	0,022	c.2039delC	p.Thr680fs	-	-	-	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T19	X:53222639	T/C	SNV	KDM5C	NM_004187.3	Mis	0,031	c.4297A>G	p.Arg1433Gly	B	D	D	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T19	4:55602662	A/T	SNV	KIT	NM_000222.2	LoF	0,034	c.2485-2A>T		-	D	-	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T19	8:71036205	T/A	SNV	NCOA2	NM_006540.2	Mis	0,024	c.4207A>T	p.Ser1403Cys	PoD	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T19	8:71078875	T/C	SNV	NCOA2	NM_006540.2	Mis	0,040	c.656A>G	p.Glu219Gly	PoD	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T19	17:47685274	T/-	INDEL	SPOP	NM_001007230.1	LoF	0,022	c.676delA	p.Ser226fs	-	-	-	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T20	17:37884119	T/C	SNV	ERBB2	NM_004448.2	Mis	0,024	c.3590T>C	p.Leu1197Ser	ProD	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

T20	20:57429077	A/G	SNV	<i>GNAS</i>	NM_001077490.1	Mis	0,027	c.570A>G	p.=	B	To	D	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T20	1:11297946	A/G	SNV	<i>MTOR</i>	NM_004958.3	Mis	0,027	c.2162T>C	p.Met721Thr	B	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T20	12:124911205	T/C	SNV	<i>NCOR2</i>	NM_006312.5	Mis	0,039	c.1291A>G	p.Met431Val	B	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T21	12:49422657	C/T	SNV	<i>KMT2D</i>	NM_003482.3	Mis	0,024	c.14336G>A	p.Gly4779Glu	B	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T21	X:70351400	A/G	SNV	<i>MED12</i>	NM_005120.2	Mis	0,029	c.4048A>G	p.Asn1350Asp	PoD	D	D	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T21	17:47696642	G/T	SNV	<i>SPOP</i>	NM_001007230.1	Mis	0,060	c.306C>A	p.Phe102Leu	PoD	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T22	11:534255	A/G	SNV	<i>HRAS</i>	NM_005343.2	Mis	0,035	c.68T>C	p.Leu23Pro	ProD	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T22	X:44733234	G/A	SNV	<i>KDM6A</i>	NM_021140.2	LoF	0,054	c.225+1G>A		-	D	-	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T22	3:10183590	T/C	SNV	<i>VHL</i>	NM_198156.2	Mis	0,022	c.59T>C	p.Val20Ala	B	To	D	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T23	X:66765101	G/T	SNV	<i>AR</i>	NM_000044.3	Mis	0,034	c.113G>T	p.Gly38Val	B	To	D	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T23	20:31024489	T/C	SNV	<i>ASXL1</i>	NM_015338.5	Mis	0,022	c.3974T>C	p.Leu1325Pro	B	To	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T23	13:32929288	A/-	INDEL	<i>BRCA2</i>	NM_000059.3	LoF	0,021	c.7298delA	p.Lys2434fs	-	-	-	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T23	5:98193966	T/-	INDEL	<i>CHD1</i>	NM_001270.2	LoF	0,021	c.4705delA	p.Ser1569fs	-	-	-	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T23	4:55970836	C/T	SNV	<i>KDR</i>	NM_002253.2	Mis	0,023	c.1961G>A	p.Cys654Tyr	ProD	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T23	12:49428628	T/C	SNV	<i>KMT2D</i>	NM_003482.3	Mis	0,038	c.10322A>G	p.Gln3441Arg	ProD	D	D	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T23	12:49421886	C/-	INDEL	<i>KMT2D</i>	NM_003482.3	LoF	0,040	c.14421delG	p.Ser4808fs	-	-	-	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T23	7:116340312	C/-	INDEL	<i>MET</i>	NM_001127500.1	LoF	0,025	c.1174delC	p.Asn393fs	-	-	-	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T23	12:124829142	C/T	SNV	<i>NCOR2</i>	NM_006312.5	LoF	0,024	c.4714+1G>A		-	D	-	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T23	3:48459398	A/T	SNV	<i>PLXNB1</i>	NM_002673.4	Mis	0,021	c.3296T>A	p.Val1099Glu	PoD	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T24	13:32972726	A/-	INDEL	<i>BRCA2</i>	NM_000059.3	LoF	0,024	c.10076delA	p.Lys3360fs	-	-	-	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T24	14:38061706	T/C	SNV	<i>FOXA1</i>	NM_004496.3	Mis	0,026	c.283A>G	p.Ser95Gly	B	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T24	20:57429868	A/G	SNV	<i>GNAS</i>	NM_001077490.1	Mis	0,024	c.1361A>G	p.Gln454Arg	-	To	-	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

T24	20:57428995	A/T	SNV	<i>GNAS</i>	NM_001077490.1	Mis	0,026	c.488A>T	p.His163Leu	-	D	-	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T24	12:124840019	G/A	SNV	<i>NCOR2</i>	NM_006312.5	Mis	0,026	c.3340C>T	p.His1114Tyr	PoD	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T25	15:90631839	T/C	SNV	<i>IDH2</i>	NM_002168.2	Mis	0,034	c.514A>G	p.Arg172Gly	ProD	D	D	ID:33731	Ausente	Ausente	Ausente
T25	X:53223613	C/T	SNV	<i>KDM5C</i>	NM_004187.3	Mis	0,052	c.3746G>A	p.Arg1249His	ProD	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T25	12:49442480	C/T	SNV	<i>KMT2D</i>	NM_003482.3	Mis	0,023	c.4093G>A	p.Val1365Ile	ProD	D	D	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T25	X:70349565	A/G	SNV	<i>MED12</i>	NM_005120.2	Mis	0,025	c.3727A>G	p.Thr1243Ala	B	To	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T26	5:98239536	TGC/-	INDEL	<i>CHD1</i>	NM_001270.2	Mis	0,020	c.330_332delGCA	p.Gln113del	-	-	-	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T26	12:49444138	A/G	SNV	<i>KMT2D</i>	NM_003482.3	Mis	0,059	c.3233T>C	p.Val1078Ala	B	To	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T27	11:108129761	T/C	SNV	<i>ATM</i>	NM_000051.3	Mis	0,020	c.2425T>C	p.Ser809Pro	B	To	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T27	17:41247941	T/A	SNV	<i>BRCA1</i>	NM_007294.3	LoF	0,035	c.594-2A>T		-	D	-	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T27	13:32911504	T/A	SNV	<i>BRCA2</i>	NM_000059.3	Mis	0,021	c.3012T>A	p.Ser1004Arg	PoD	To	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T27	1:6181558	A/G	SNV	<i>CHD5</i>	NM_015557.2	Mis	0,021	c.4775T>C	p.Val1592Ala	B	To	D	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T27	X:53223773	C/T	SNV	<i>KDM5C</i>	NM_004187.3	Mis	0,025	c.3586G>A	p.Gly1196Arg	ProD	To	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T27	12:49423227	C/A	SNV	<i>KMT2D</i>	NM_003482.3	Mis	0,021	c.14032G>T	p.Ala4678Ser	ProD	D	D	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T27	12:49419986	A/G	SNV	<i>KMT2D</i>	NM_003482.3	Mis	0,024	c.15763T>C	p.Phe5255Leu	B	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T27	12:49431151	T/C	SNV	<i>KMT2D</i>	NM_003482.3	Mis	0,045	c.9988A>G	p.Met3330Val	B	To	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T27	12:49420787	T/C	SNV	<i>KMT2D</i>	NM_003482.3	Mis	0,048	c.14962A>G	p.Lys4988Glu	ProD	D	D	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T27	2:48030646	C/T	SNV	<i>MSH6</i>	NM_001281492.1	Mis	0,026	c.2870C>T	p.Pro957Leu	ProD	D	D	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T27	8:71060703	C/-	INDEL	<i>NCOA2</i>	NM_006540.2	LoF	0,033	c.2410delG	p.Asp804fs	-	-	-	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T27	12:124824977	T/A	SNV	<i>NCOR2</i>	NM_006312.5	Mis	0,045	c.5351A>T	p.His1784Leu	ProD	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T27	3:48460689	T/A	SNV	<i>PLXNB1</i>	NM_002673.4	Mis	0,033	c.2796A>T	p.Glu932Asp	B	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T27	3:48465339	C/T	SNV	<i>PLXNB1</i>	NM_002673.4	Mis	0,043	c.682G>A	p.Ala228Thr	PoD	D	To	Presente	Ausente	5,02E-02	Ausente

T28	X:44733171	C/T	SNV	<i>KDM6A</i>	NM_021140.2	Mis	0,029	c.163C>T	p.Arg55Cys	PoD	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T29	1:6195291	T/A	SNV	<i>CHD5</i>	NM_015557.2	LoF	0,033	c.2869A>T	p.Lys957Ter	-	D	-	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T29	4:55961803	T/A	SNV	<i>KDR</i>	NM_002253.2	LoF	0,035	c.2758A>T	p.Lys920Ter	-	D	-	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T29	12:49435272	G/A	SNV	<i>KMT2D</i>	NM_003482.3	Mis	0,025	c.6281C>T	p.Ala2094Val	PoD	To	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T29	X:70357189	C/A	SNV	<i>MED12</i>	NM_005120.2	Mis	0,024	c.5704C>A	p.Gln1902Lys	B	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T29	1:11174941	C/T	SNV	<i>MTOR</i>	NM_004958.3	Mis	0,021	c.7093G>A	p.Ala2365Thr	ProD	D	D	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T29	8:71082493	A/G	SNV	<i>NCOA2</i>	NM_006540.2	Mis	0,022	c.485T>C	p.Ile162Thr	ProD	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T29	17:7578444	G/C	SNV	<i>TP53</i>	NM_001126115.1	Mis	0,021	c.90C>G	p.Ile30Met	ProD	D	D	ID: 44125	Ausente	Ausente	Ausente
T29	3:10183625	G/T	SNV	<i>VHL</i>	NM_198156.2	LoF	0,032	c.94G>T	p.Glu32Ter	-	D	-	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T30	1:11319378	T/C	SNV	<i>MTOR</i>	NM_004958.3	Mis	0,022	c.89A>G	p.Lys30Arg	ProD	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T31	2:48028091	T/A	SNV	<i>MSH6</i>	NM_001281492.1	LoF	0,031	c.2579T>A	p.Leu860Ter	-	D	-	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T32	12:124824960	T/C	SNV	<i>NCOR2</i>	NM_006312.5	Mis	0,023	c.5368A>G	p.Thr1790Ala	B	To	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T33	12:124911169	T/C	SNV	<i>NCOR2</i>	NM_006312.5	Mis	0,025	c.1327A>G	p.Lys443Glu	ProD	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T34	20:31023030	G/C	SNV	<i>ASXL1</i>	NM_015338.5	Mis	0,031	c.2515G>C	p.Asp839His	B	To	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T34	11:108124682	C/G	SNV	<i>ATM</i>	NM_000051.3	Mis	0,026	c.2040C>G	p.Phe680Leu	B	To	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T34	14:38061230	C/G	SNV	<i>FOXA1</i>	NM_004496.3	Mis	0,037	c.759G>C	p.Met253Ile	ProD	D	D	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T34	12:49431136	G/A	SNV	<i>KMT2D</i>	NM_003482.3	Mis	0,023	c.10003C>T	p.Pro3335Ser	B	To	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T34	X:70349548	G/A	SNV	<i>MED12</i>	NM_005120.2	Mis	0,022	c.3710G>A	p.Gly1237Asp	PoD	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T34	12:124824932	T/C	SNV	<i>NCOR2</i>	NM_006312.5	Mis	0,040	c.5396A>G	p.Asp1799Gly	B	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T35	13:93879833	T/G	SNV	<i>GPC6</i>	NM_005708.3	Mis	0,036	c.124T>G	p.Phe42Val	PoD	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T35	X:44929109	A/G	SNV	<i>KDM6A</i>	NM_021140.2	Mis	0,029	c.2209A>G	p.Thr737Ala	ProD	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T36	11:108138017	T/-	INDEL	<i>ATM</i>	NM_000051.3	LoF	0,059	c.2586delT	p.Asp863fs	-	-	-	Ausente	rs145961796	0,000009	Ausente



T36	3:48460724	C/T	SNV	<i>PLXNB1</i>	NM_002673.4	Mis	0,032	c.2761G>A	p.Gly921Ser	B	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T36	17:47684725	C/A	SNV	<i>SPOP</i>	NM_001007230.1	LoF	0,084	c.724G>T	p.Glu242Ter	-	D	-	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T37	20:31021364	A/-	INDEL	<i>ASXL1</i>	NM_015338.5	LoF	0,056	c.1363delA	p.Lys455fs	-	-	-	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T37	17:41258491	T/C	SNV	<i>BRCA1</i>	NM_007294.3	Mis	0,036	c.194A>G	p.Lys65Arg	ProD	D	D	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T37	1:6202593	C/T	SNV	<i>CHD5</i>	NM_015557.2	Mis	0,145	c.2116G>A	p.Glu706Lys	ProD	D	D	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T37	10:123325051	G/A	SNV	<i>FGFR2</i>	NM_023029.2	LoF	0,065	c.110-958C>T		-	D	-	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T37	20:57429964	G/-	INDEL	<i>GNAS</i>	NM_001077490.1	LoF	0,023	c.1457delG	p.Arg486fs	-	-	-	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T37	X:53245081	A/G	SNV	<i>KDM5C</i>	NM_004187.3	Mis	0,033	c.859T>C	p.Ser287Pro	B	To	D	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T37	X:53223651	C/G	SNV	<i>KDM5C</i>	NM_004187.3	Mis	0,097	c.3708G>C	p.Trp1236Cys	ProD	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T37	4:55970821	A/G	SNV	<i>KDR</i>	NM_002253.2	Mis	0,044	c.1976T>C	p.Leu659Pro	ProD	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T37	12:49431611	A/-	INDEL	<i>KMT2D</i>	NM_003482.3	LoF	0,036	c.9528delT	p.Ser3176fs	-	-	-	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T37	12:49432512	T/G	SNV	<i>KMT2D</i>	NM_003482.3	Mis	0,043	c.8627A>C	p.Gln2876Pro	B	D	To	Ausente	Ausente	1,28E-02	Ausente
T37	12:49432513	G/A	SNV	<i>KMT2D</i>	NM_003482.3	LoF	0,051	c.8626C>T	p.Gln2876Ter	-	D	-	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T37	12:49423021	T/A	SNV	<i>KMT2D</i>	NM_003482.3	LoF	0,058	c.14076-2A>T		-	D	-	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T37	12:49428025	T/C	SNV	<i>KMT2D</i>	NM_003482.3	Mis	0,059	c.10565A>G	p.Gln3522Arg	ProD	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T37	12:49425535	T/-	INDEL	<i>KMT2D</i>	NM_003482.3	LoF	0,086	c.12953delA	p.Lys4318fs	-	-	-	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T37	12:49427486	G/A	SNV	<i>KMT2D</i>	NM_003482.3	Mis	0,184	c.11002C>T	p.Pro3668Ser	B	To	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T37	X:70357786	A/T	SNV	<i>MED12</i>	NM_005120.2	Mis	0,039	c.6037A>T	p.Thr2013Ser	ProD	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T37	1:11199449	G/A	SNV	<i>MTOR</i>	NM_004958.3	Mis	0,024	c.5042C>T	p.Pro1681Leu	ProD	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T37	8:71036153	G/T	SNV	<i>NCOA2</i>	NM_006540.2	Mis	0,036	c.4259C>A	p.Pro1420His	ProD	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T37	8:71044217	G/-	INDEL	<i>NCOA2</i>	NM_006540.2	LoF	0,055	c.3179delC	p.Pro1060fs	-	-	-	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T37	1:115252233	C/T	SNV	<i>NRAS</i>	NM_002524.4	Mis	0,028	c.407G>A	p.Ser136Asn	B	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

T37	3:48457495	G/T	SNV	<i>PLXNB1</i>	NM_002673.4	Mis	0,027	c.3562C>A	p.Leu1188Met	ProD	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T37	3:48451061	A/-	INDEL	<i>PLXNB1</i>	NM_002673.4	LoF	0,034	c.5857delT	p.Tyr1953fs	-	-	-	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T38	X:66765500	T/C	SNV	<i>AR</i>	NM_000044.3	Mis	0,082	c.512T>C	p.Phe171Ser	ProD	D	D	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T38	X:66766070	G/C	SNV	<i>AR</i>	NM_000044.3	Mis	0,062	c.1082G>C	p.Ser361Thr	B	To	D	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T38	17:41197772	A/C	SNV	<i>BRCA1</i>	NM_007294.3	Mis	0,058	c.5515T>G	p.Leu1839Val	ProD	D	D	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T38	X:70354661	A/C	SNV	<i>MED12</i>	NM_005120.2	Mis	0,021	c.4826A>C	p.Asn1609Thr	PoD	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T38	12:124831225	A/C	SNV	<i>NCOR2</i>	NM_006312.5	Mis	0,127	c.4244T>G	p.Val1415Gly	ProD	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T38	8:99539052	T/-	INDEL	<i>STK3</i>	NM_001256313.1	LoF	0,030	c.902delA	p.Gln301fs	-	-	-	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T39	7:148515196	T/C	SNV	<i>EZH2</i>	NM_004456.4	Mis	0,033	c.1013A>G	p.Glu338Gly	PoD	D	D	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T39	2:48027578	A/C	SNV	<i>MSH6</i>	NM_001281492.1	Mis	0,078	c.2066A>C	p.Glu689Ala	ProD	D	D	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T40	13:32930598	T/C	SNV	<i>BRCA2</i>	NM_000059.3	Mis	0,430	c.7469T>C	p.Ile2490Thr	B	D	-	Ausente	Ausente	Ausente	0,021346
T40	X:44732915	A/C	SNV	<i>KDM6A</i>	NM_021140.2	Mis	0,129	c.118A>C	p.Ser40Arg	B	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T40	12:49425668	G/-	INDEL	<i>KMT2D</i>	NM_003482.3	LoF	0,054	c.12820delC	p.Leu4274fs	-	-	-	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T40	12:124816985	T/G	SNV	<i>NCOR2</i>	NM_006312.5	Mis	0,078	c.6784A>C	p.Thr2262Pro	PoD	To	To	Ausente	rs76392753	Ausente	Ausente
T41	X:66765665	T/A	SNV	<i>AR</i>	NM_000044.3	LoF	0,046	c.677T>A	p.Leu226Ter	-	D	-	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T41	1:6191703	C/T	SNV	<i>CHD5</i>	NM_015557.2	Mis	0,031	c.3250G>A	p.Asp1084Asn	PoD	D	D	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T41	1:6214929	A/G	SNV	<i>CHD5</i>	NM_015557.2	Mis	0,036	c.536T>C	p.Ile179Thr	ProD	D	D	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T41	1:6212566	G/C	SNV	<i>CHD5</i>	NM_015557.2	Mis	0,547	c.776C>G	p.Ser259Cys	B	D	D	Ausente	Ausente	0,001013	0,001642
T41	17:37883252	C/T	SNV	<i>ERBB2</i>	NM_004448.2	Mis	0,037	c.3155C>T	p.Thr1052Ile	B	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T41	15:90631610	C/T	SNV	<i>IDH2</i>	NM_002168.2	Mis	0,036	c.659G>A	p.Gly220Asp	ProD	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T41	X:53240695	A/T	SNV	<i>KDM5C</i>	NM_004187.3	Mis	0,032	c.1385T>A	p.Leu462Gln	ProD	D	D	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T41	X:44929253	A/G	SNV	<i>KDM6A</i>	NM_021140.2	Mis	0,028	c.2353A>G	p.Met785Val	PoD	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

T41	12:49425524	G/A	SNV	<i>KMT2D</i>	NM_003482.3	LoF	0,032	c.12964C>T	p.Gln4322Ter	-	D	-	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T41	12:49444341	C/-	INDEL	<i>KMT2D</i>	NM_003482.3	LoF	0,066	c.3030delG	p.Pro1011fs	-	-	-	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T41	X:70356847	G/A	SNV	<i>MED12</i>	NM_005120.2	Mis	0,030	c.5519G>A	p.Gly1840Asp	B	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T41	X:70348470	A/G	SNV	<i>MED12</i>	NM_005120.2	Mis	0,030	c.3377A>G	p.Asp1126Gly	ProD	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T41	3:48459736	C/T	SNV	<i>PLXNB1</i>	NM_002673.4	Mis	0,028	c.3086G>A	p.Cys1029Tyr	ProD	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T42	13:32972626	A/T	SNV	<i>BRCA2</i>	NM_000059.3	LoF	0,498	c.9976A>T	p.Lys3326Ter	-	D	-	Ausente	rs11571833	0,007017	0,004926
T42	1:6196607	A/G	SNV	<i>CHD5</i>	NM_015557.2	Mis	0,030	c.2666T>C	p.Leu889Pro	PoD	D	D	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T42	12:49434005	G/-	INDEL	<i>KMT2D</i>	NM_003482.3	LoF	0,022	c.7548delC	p.Asn2517fs	-	-	-	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T42	12:49427338	T/G	SNV	<i>KMT2D</i>	NM_003482.3	Mis	0,284	c.11150A>C	p.Gln3717Pro	ProD	D	D	Ausente	Ausente	1,68E-02	Ausente
T43	17:37872620	A/T	SNV	<i>ERBB2</i>	NM_004448.2	Mis	0,022	c.1580A>T	p.Gln527Leu	ProD	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T43	12:49438565	T/G	SNV	<i>KMT2D</i>	NM_003482.3	Mis	0,059	c.4925A>C	p.Asp1642Ala	PoD	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T43	12:124819722	T/C	SNV	<i>NCOR2</i>	NM_006312.5	Mis	0,038	c.6370A>G	p.Lys2124Glu	PoD	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
T43	3:48462075	T/C	SNV	<i>PLXNB1</i>	NM_002673.4	Mis	0,027	c.2027A>G	p.Gln676Arg	B	D	To	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

Legenda: Mis – Missense; LoF – Perda de função; PoD – Possibly damaging; ProD - Probably damaging; B – Benign; D – Damaging; T – Tolerated.