Leonardo Tomiatti da Costa

**Estudo de alterações gênicas em amostras de sarcomas e
carcinossarcomas uterinos**

Dissertação apresentada a Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Obstetrícia e Ginecologia

Orientadora: Dra. Kátia Cândido Carvalho

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 1 de novembro de 2011. A
versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

São Paulo

2018

Leonardo Tomiatti da Costa

**Estudo de alterações gênicas em amostras de sarcomas e
carcinossarcomas uterinos**

Dissertação apresentada a Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Obstetrícia e Ginecologia

Orientadora: Dra. Kátia Cândido Carvalho

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 1 de novembro de 2011. A
versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

São Paulo

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Costa, Leonardo Tomiatti da
Estudo de alterações gênicas em amostras de
sarcomas e carcinossarcomas uterinos / Leonardo
Tomiatti da Costa. -- São Paulo, 2018.
Dissertação (mestrado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Obstetrícia e Ginecologia.
Orientador: Kátia Cândido Carvalho.

Descritores: 1.Sarcoma 2.Útero 3.Carcinossarcoma
4.Sequenciamento de nova geração 5.Alterações
genéticas 6.Mutação/genética 7.Neoplasias dos
genitais femininos

USP/FM/DBD-253/18

Responsável: Kátia Maria Bruno Ferreira - CRB-8/6008

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Marilene e Agostinho, às minhas avós Maria e Lourdes (In memoriam), e ao meu avô, Hermogenes (In memoriam). O apoio e o amor incondicional foram fontes de força para conclusão desse trabalho.

AGRADECIMENTOS

Dra. Katia Cândido Carvalho – Agradeço a imensa paciência, o incentivo e apoio técnico-científico durante a execução deste trabalho. Seu conhecimento científico foi chave para a compreensão e execução de todas as técnicas.

Prof. Dr. Gustavo Arantes Rosa Maciel – muito obrigado por todas as conversas de corredor e todo o engajamento e curiosidade por este trabalho. Agradeço também por todos os incentivos acadêmicos e profissionais que me ampararam até aqui.

Prof. Dr. Edmund Chada Baracat – Possuo imensa gratidão pelo suporte oferecido na pós-graduação e por acreditar em todos os seus alunos, independentemente de ser orientador ou não. Admiro sua personalidade, competência, intelectualidade e senso de justiça.

Dr. José Maria Soares Junior – Agradeço pelo apoio e pelas críticas construtivas que ajudaram a melhorar este projeto. Tenho grande apreço por sua competência e intelectualidade.

Prof. Dr. Nilo Bozzini – Pelo imenso amor por suas pacientes e pelo seu trabalho no Hospital das Clínicas, inspirador e humano. Agradeço por todas as ideias e incentivos dados para a realização e conclusão deste trabalho.

Dra. Claudia de Paula – Pela ajuda e por sua competência nos experimentos do sequenciamento de nova geração. Seus ensinamentos e auxílio foram chave para a execução e conclusão deste trabalho.

Dra. Giovanna Torrezan – Por todo o apoio e ensinamentos sobre as análises de dados do sequenciamento de nova geração. Sua ajuda e ensinamentos foram cruciais para que este trabalho fosse concluído.

Kelly Pedrozo Ferreira – Minha amiga e companheira desde os primórdios da vida acadêmica, desde que éramos apenas sonhadores na universidade. Obrigado por todas as correções, ensinamentos e paciência. Sua amizade e competência foram peça chave para conclusão deste trabalho.

Thiago Hideki Gonçalves – Pelo companheirismo, amizade e ensinamentos que apenas um profissional competente e correto pode transmitir. Obrigado por todas as risadas, necessárias, nos momentos de tensão e por toda ajuda neste trabalho.

Natalia Garcia – Minha amiga e companheira de pesquisa. Sua competência e amor pela ciência ultrapassam as barreiras acadêmicas. Obrigado por todos os ensinamentos, correções e risadas pelas manhãs.

Rodrigo Rodrigues Marcondes – Grande amigo e fonte de inspiração. Profissional incrível e com enorme capacidade de exposição e excelente didática. Fica registrado meu agradecimento pelo total apoio.

Alunos, profissionais e grandes amigos do Laboratório de Ginecologia Estrutural e Molecular (LIM58). – Agradeço imensamente por todos, sem exceções a esses grandes amigos: **Marinalva Almeida, Juciara da Costa Silva, Laura dos Anjos, Bruna Almeida, Ana Maria Ritti, Henderson Narciso Junior e Isabela Faria**, minha eterna gratidão a todos vocês. Em especial para **Luiza Pimenta, Giulia Araujo e Giovana Maffazioli**.

Ao **A.C Camargo Cancer Center** pela infraestrutura e a **Dra. Dirce Maria Carraro** pela colaboração, ambos essenciais para a realização desse trabalho. Minha enorme gratidão.

À **Divisão de Genética do Grupo Fleury** que compartilhou inúmeros ensinamentos possibilitando a conclusão deste trabalho.

Aos meus familiares – Minha eterna gratidão pelo incentivo e por acreditarem no meu potencial.

À **Bianca Botine** – Minha companheira, que me ajudou a superar momentos difíceis e que por consequência indireta, auxiliou na conclusão deste trabalho.

Aos meus amigos – Minha eterna gratidão a todos vocês que acreditaram em mim e no meu potencial. Em especial os amigos **Thales Garau, Amandio Fragoso, Diogo Araujo, Renan Zaguini, Bruno Alves, Gabriela Trevizan, Douglas Algayer, Claudio Petez, Bruno Cassado, Fernando Mirandola, Rafael dos Santos, Emilyn Borges, Mariana Thainá, Luis Gustavo, Marcos Matos, Anderson Rocha, Rodrigo Rocha e Marcelo Lima.**

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – Agradeço pelo suporte financeiro para que este projeto pudesse ser concluído e pela bolsa concedida (Processo 2016/03163-6).

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

ABSTRACT

1.	INTRODUÇÃO	1
1.1.	Sarcomas e carcinosarcomas uterinos	1
1.1.1.	Leiomiossarcoma	3
1.1.2.	Sarcomas do Estroma Endometrial	4
1.1.3.	Adenossarcomas	5
1.1.4.	Carcinosarcomas	7
1.2.	Etiologia	8
1.3.	Prognóstico e Tratamento	9
1.4.	Alterações genéticas comumente relacionadas ao surgimento dos sarcomas uterinos	10
1.5.	Sequenciamento de Nova Geração (NGS) na identificação de alterações genéticas nos sarcomas e carcinosarcomas uterinos	12
2.	OBJETIVOS	17
2.1.	Geral	17
2.2.	Específicos	17
3.	CASUÍSTICA E MÉTODOS	18
3.1.	Seleção das amostras	18
3.2.	Extração e quantificação do material genético e sua quantificação	18
3.3.	Quantificação do material genético em Fluorímetro	20

3.4.	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	21
3.5.	Reação de sequenciamento de nova geração (SNG)	22
3.6.	Análise Estatística	24
4.	RESULTADOS	26
5.	DISCUSSÃO	47
6.	CONCLUSÕES	55
7.	ANEXOS	56
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 -** Figura esquemática apresentando as etapas e os princípios da técnica de Sequenciamento de Nova Geração utilizada em nosso estudo Adaptada de: *genomics.cn/en/navigation (Ion Torrent Worklfow)* 15
- Figura 2 -** Distribuição global das amostras incluídas no trabalho e que foram processadas, de acordo com seus subtipos histológicos. Carcinossarcomas 35%, Leiomiossarcomas 34%, Adenossarcoma 3%, Sarcomas do Estroma Endometrial de Alto Grau 15%, Sarcoma do Estroma Endometrial de Baixo Grau 8%, Sarcoma Indiferenciado 5 %..... 27
- Figura 3 -** Fluxograma das amostras incluídas no presente estudo. De 66 amostras iniciais, somente 14 se mantiveram até o final das análises. A grande maioria das perdas se deu na etapa do PCR multiplex não permitindo que as amostras fossem incluídas nos chips (painéis) contendo os genes a serem avaliados. 31
- Figura 4 -** Gel de agarose representativo dos perfis obtidos nas reações de PCR Multiplex para avaliação e seleção das amostras selecionadas. As amostras estão indicadas pelos números de 1-11 e padrão de peso molecular (100pb) - PM. A seta indica a altura esperada para a migração das duas bandas 35
- Figura 5 -** Diagrama de Venn (Oliveros J.C, 2015) construído utilizando os dados do sequenciamento gênico das amostras. Os números representam as mutações compartilhadas e individuais para cada subtipo histológico avaliado. Os nomes dos genes estão indicados 43
- Figura 6 -** Distribuição das mutações nas amostras nos subtipos histológicos e efeitos biológicos compatíveis com o banco de dados do *cBioPortal for CancerGenomics*.

(<http://www.cbioportal.org/>). Cada retângulo cinza representa uma amostra conforme sequência indicada no canto inferior à direita. Estão apresentados os genes com maior frequência de alterações. As legendas para cada tipo de alteração (proteína truncada – quadrado preto ou mutação missense – quadrado verde) estão indicadas 45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Estadiamento FIGO para os sarcomas e carcinossarcomas uterinos (2009)*	2
Tabela 2 -	Componentes da reação de PCR convencional utilizada para verificar a qualidade das amostras (integridade)	21
Tabela 3 -	Condições de ciclagens utilizadas nas reações de PCR convencional (Veritti) para avaliar a fragmentação do material genético obtido	22
Tabela 4 -	Comparação entre os resultados das quantificações realizadas no Quantifluor e NanoDrop para cada amostra de DNA	28
Tabela 5 -	Resultados do sequenciamento teste das amostras. Dados dos <i>reads</i> , dos índices de homogeneidade das amostras e qualidade da taxa de cobertura em 1x, 20x, 100x e 500x, em ambos os painéis utilizados (14 genes e 409 genes)	33
Tabela 6 -	Análise do perfil das bibliotecas com os diferentes tamanhos de fragmentos sequenciados para cada uma das amostras, utilizando os dois painéis avaliados (14 e 409 genes)	33
Tabela 7 -	Perfil qualitativo das amostras e bibliotecas após tratamento com a enzima UDG para reduzir o índice de transições por transversões (TS/TV)	36
Tabela 8 -	Dados do Sequenciamento de Nova Geração. Resultados dos <i>reads</i> , dos índices de homogeneidade das amostras e qualidade da taxa de cobertura em 1x, 20x, 100x e 500x	38
Tabela 9 -	Total de variantes resultantes da aplicação de filtros para aumentar a especificidade dos resultados do SNG (maior estringência)	40

Tabela 10 -	Número de mutações mais comuns nos genes encontrados por classificação histológica. Genes presentes em duas ou mais amostras de sarcomas uterinos e carcinossarcomas	41
Tabela 11 -	Mutações mais comumente encontradas no estudo, suas posições cromossômicas, efeitos e relevância clínica	42

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTB	Beta Actina
AKT	<i>Protein Kinase</i>
ADS	Adenossarcoma
ATM	<i>ATM serine/threonine kinase</i>
ATRX	Helicase dependente de ATP
BCL-2	<i>B cell lymphoma 2</i>
BRCA1	<i>Breast Cancer 1</i>
Ca125	Antígeno do câncer 125
CD10	Antígeno comum da leucemia linfoblastica aguda
CDK4	<i>Cyclin dependent kinase 4</i>
COSMIC	<i>Catalogue of Somatic Mutations in Cancer</i>
COX2	<i>Cytochrome c oxidase subunit 2</i>
CREBBP	<i>CREB binding protein</i>
CCS	Carcinossarcoma
DAXX	<i>Death domain associated protein</i>
DICER1	<i>Dicer1, ribonuclease III</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNMT3A	<i>DNA methyltransferase 3 alpha</i>
DNTP's	Dideoxynucleotideos
DST	<i>Dystonin</i>
EGFR1	Fator de crescimento da epiderme tipo1
EGFR2	Fator de crescimento da epiderme tipo 2

EPC1	<i>Enhancer of polycomb homolog 1</i>
EPHA7	<i>EPH receptor A7</i>
ERB2	Receptor de tiroxina kinase do tipo 2
ERBB4	<i>ERB-B2 receptor tyrosine kinase 4</i>
FHF1	<i>Fibroblast growth factor homologous factor 1</i>
GAPDH	<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
GNRHR	Receptor do hormônio liberador de gonodotrofina
HER- 2	Receptor do fator de crescimento epidérmico humano tipo 2
IFNγ	<i>Interferon gamma</i>
IGF1	Fator de crescimento insulínico do tipo 1
IGF2	Fator de crescimento insulínico do tipo 2
IGFR	Receptor do fator de crescimento insulina
JAK1	<i>Janus kinase 1</i>
JAZ1	<i>Jasmonate-zim-domain protein 1</i>
KAT6B	<i>Lysine acetyltransferase 6B</i>
KI67	Proteína nuclear associada com a proliferação celular
KMT2D	<i>Lysine methyltransferase 2D</i>
KNL1	<i>Kinetochore scaffold 1</i>
KRAS	<i>Kras proto-oncogene</i>
LMS	Leiomiossarcoma
MDM2	<i>Murine double minute 2</i>
MED12	Proteína relacionada com o surgimento de leiomiomas – mediator complex subunit 12
MgCl	Cloreto de Magnésio

MTOR	<i>Mechanistic target of rapamycin</i>
NEE	Nódulo do estroma de endométrio
NIN	<i>Nineine</i>
p16	<i>Cyclin dependente-kinase inhibitor 2A</i>
p53	Proteína supressora de tumor 53
PARP1	Poly (ADP-ribose) polimerase do tipo 1
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDE4DIP	<i>Phosphodiesterase 4D interacting protein</i>
PH	Potencial Hidrogênico
PIK3	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>
PIK3CA	<i>Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate N3-Kinase Catalytic Subunit Alpha</i>
PRKDC	<i>Protein kinase, DNA activated, catalytic polypeptide</i>
PSMB9	Proteossoma subunidade beta tipo 9
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
RB1	<i>Transcriptional corepressor 1</i>
RE	Receptor de estrogênio
RNA	Ácido Ribonucleico
RNF213	<i>Ring finger protein 213</i>
RP	Receptor de progesterona
SEE	Sarcoma do estroma endometrial
SEE-AG	Sarcoma do estroma endometrial de alto grau
SEE-BG	Sarcoma do estroma endometrial de baixo grau
SNG	Sequenciamento de Nova Geração

SNG	Sequenciamento de nova geração
SNV	<i>Single Nucleotide Variant</i>
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
STAT1	<i>Signal transducer and activator of transcription 1</i>
SUI	Sarcoma uterino indiferenciado
TAQ	<i>Thermus aquaticus</i>
TGF-β	Fator de transformação do crescimento β
TMMM	Tumor mulleriano misto maligno
TRRAP	<i>Transformation/transcription domain associated protein</i>
TSC2	<i>TSC complex subunit 2</i>
TWIST1	<i>Twist family bHLH transcription factor 1</i>
UDG	<i>Uracil-DNA glycosilase</i>
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial
WT1	Tumor de Willms do tipo 1

Costa LT. *Estudo de alterações gênicas em amostras de sarcomas e carcinosarcomas uterinos* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

Os sarcomas uterinos são tumores mesodérmicos raros que compreendem cerca de 3% de todos os cânceres nesse órgão. Apresentam diversidade histológica, comportamento agressivo, disseminação precoce e altas taxas de mortalidade. Recentemente, os carcinosarcomas (CS) foram reclassificados histologicamente como carcinomas. Neste trabalho, os CS foram incluídos na casuística tanto para fins de comparação de seu componente mesenquimal, como por ainda fazerem parte da maioria dos estudos sobre sarcomas de corpo uterino e também da última classificação da WHO (*World Health Organization*). Devido à sua diversidade e raridade, não há consenso relacionado aos fatores de risco para pior prognóstico e tratamento adequados para esses tumores. Informações sobre seus perfis gênicos e proteômicos poderiam contribuir na caracterização de marcadores moleculares que auxiliassem no diagnóstico e prognóstico desses tumores, bem como no entendimento de sua biologia e comportamento clínico. Assim, nos propusemos a avaliar a presença de alterações gênicas nesses tumores, utilizando um painel de 409 genes, oncogenes e supressores de tumor, frequentemente mutados em tumores sólidos. Para isso, foram selecionadas 66 amostras, das quais 14 foram sequenciadas, incluindo, 5 carcinosarcomas (CCS), 4 leiomiiossarcomas (LMS), 4 sarcomas de estroma endometrial (SEE) e 1 adenossarcoma (ADS). As reações foram realizadas utilizando a plataforma *Ion Proton System* (ThermoFisher) de Sequenciamento de Nova Geração. Nas 14 amostras encontramos 27 LoF e 40 mutações *missenses*, numa média de 39 inserções e 52 deleções por amostra, totalizando 70 mutações. Dessas, 25 encontram-se no banco de dados COSMIC. Os genes mais comumente mutados em nossa amostragem foram: *TP53* (50%), *KMT2D* (36%), *ATM* (29%), *DICER1* (21%), *PIK3CA* (21%), *TRRAP* (21%). Nosso objetivo principal era encontrar mutações específicas para cada subtipo histológico, porém apenas os SEEs (*PDE4DIP*) e os CCS (*ERBB4* e *PIK3CA*) tiveram mutações específicas. Em outra análise, observamos que todos os subtipos histológicos compartilham o gene *KMT2D*. Embora não tenha sido possível estabelecer um

perfil mutacional para cada subtipo histológico avaliado, nossos resultados abrem perspectivas para uma nova linha de pesquisa nos sarcomas de corpo do útero e certamente contribuem para um melhor entendimento dessas neoplasias.

Descritores: sarcoma; útero; carcinosarcoma; sequenciamento de nova geração; alterações genéticas; mutação/genética; neoplasias dos genitais femininos.

Costa LT. *Study of gene alterations in uterine sarcomas and carcinosarcoma samples* [dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

Uterine sarcomas are rare mesodermal tumors that comprise about 3% of all cancers in this organ. They present histological diversity, aggressive behavior, early dissemination and high mortality rates. Recently, carcinosarcomas (CCS) were histological reclassified as carcinomas. Here, we have included them in our series for purposes of comparison of the mesenchymal component and also because these tumors still form part of both the majority of studies and the WHO's latest classification for uterine sarcomas (World Health Organization). Because of their diversity and rarity, there is no consensus regarding the risk factors for poor prognosis and appropriate treatment for these tumors. Thus, information about their gene and protein profiles can help in the diagnosis and prognosis of these tumors, as well as in the understanding of their biology and clinical behavior. We performed the New Generation Sequencing of 14 samples of uterine sarcomas (5 CCS, 4 LMS, 4 SEE and 1 ADS, using the Ion Proton System platform (ThermoFisher).) Among the 14 samples, we found 27 LoF (loss of gene function) and 40 missense mutations, with a mean of 39 insertions and 52 deletions per sample, totaling 70 mutations, 25 described in the COSMIC database. The most commonly mutated genes in our sample were TP53 (50%), KMT2D (36%), ATM (29%), DICER1 (21%), PIK3CA (21%), TRRAP (21%). Our main objective was to find specific mutations for each histological subtype, but only SEEs (PDE4DIP) and CCS (ERBB4 and PIK3CA) had specific mutations. In another analysis, we observed that all the histological subtypes share the *KMT2D* gene, which will be studied in future analyzes. Others analyzes, using a custom panel, are necessary to understand these mutations and its biological implication in uterine carcinosarcoma and sarcomas.

Descriptors: sarcoma; uterus; carcinosarcoma; next generation sequencing; genetic Alterations; Mutations/ genetics; genital neoplasms, female.

INTRODUÇÃO

1.1. Sarcomas e carcinosarcomas uterinos

Os sarcomas são tumores heterogêneos raros que acometem o trato genital feminino, originando-se de tecidos como músculo, gordura, ossos e tecido fibroso. O sarcoma ginecológico mais comum é o sarcoma uterino com 90% dos casos.

No contexto de sua constituição, os sarcomas uterinos podem ser divididos ainda em dois tipos, a saber: 1) **puros**, em que somente os elementos mesodérmicos malignos estão presentes (leiomiossarcomas e sarcoma do estroma endometrial); e 2) **mistos**, em que os elementos mesodérmicos e epiteliais malignos estão presentes (carcinosarcomas e adenossarcoma) (Wenet *et al.*, 2016). Atualmente os carcinosarcomas são considerados carcinomas metaplásicos, ou seja, carcinomas de endométrio tipo II com áreas de metaplasia sarcomatosa (Almeida *et al.*, 2014).

Esses tumores podem se originar tanto do estroma endometrial como do próprio músculo (Garcia-Martinez *et al.*, 2011; Koh *et al.*, 2015). Quando o estroma endometrial sofre alteração maligna pode ser acompanhado por componente epitelial maligno, sendo o tumor denominado de *carcinosarcoma* ou tumor mulleriano misto. Quando se encontra associação entre componente mesenquimal maligno e componente epitelial benigno o tumor é classificado como *adenossarcoma*. Quando não há o componente epitelial, somente o estromal, o tumor é chamado de *sarcoma do estroma endometrial*. Os tumores originados da transformação maligna do tecido muscular liso (miométrio) são conhecidos como *leiomiossarcomas* (Denschlag *et al.*, 2015).

Tabela 1 – Estadiamento FIGO (Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia) para os sarcomas e carcinosarcomas uterinos (2009)*

ESTADIO	CARACTERÍSTICAS
Leiomiossarcomas	
I	Tumor limitado ao útero
IA	< 5 cm
IB	> 5 cm
II	Tumor com Extensão à Pelve
IIA	Envolvimento de Anexos
IIB	Extensão ao tecido pélvico extrauterino
III	Tumor invade os tecidos abdominais
IIIA	Um sítio
IIIB	> Um sítio
IIIC N1	Metástase aos linfonodos pélvicos ou para-aórticos
IV	
IVA	Tumor invade bexiga e/ ou reto
IVB	Metástase a distância
Adenossarcomas e Sarcomas do Estroma Endometrial	
I	Tumor limitado ao útero
IA	Tumor limitado a endométrio/ colo uterino sem invasão do miométrio
IB	Invasão igual ou inferior à metade do miométrio
IC	Invasão de mais da metade do miométrio
II	Tumor com Extensão à Pelve
IIA	Envolvimento de Anexos
IIB	Extensão ao tecido pélvico extrauterino
III	Tumor invade os tecidos abdominais
IIIA	Um sítio
IIIB	> Um Sítio
IIIC N1	Metástase aos linfonodos pélvicos ou para-aórticos
IV	
IVA	Tumor invade bexiga e/ ou reto
IVB	Metástase à distância
Carcinosarcomas - devem ser estadiados como os carcinomas do endométrio.	

*Revisado pela *American Cancer Society, Staging for Uterine Sarcomas* (2017)

Apesar de sua baixa prevalência, os sarcomas uterinos despertam grande interesse por suas múltiplas características morfológicas e clínicas, como altas taxas de recidiva local, metástases à distância e prognóstico desfavorável com sobrevida total em dois anos menor que 50% (Wen *et al.*, 2016).

1.1.1. Leiomiossarcoma

Os leiomiossarcomas (LMS) são os mais comuns, compreendem cerca de 40-50 % de todos os sarcomas uterinos e cerca de 1-3 % de todos os tumores uterinos. São caracterizados por sua agressividade e mau prognóstico. O LMS possui alta recorrência mesmo em estágios iniciais e geralmente acomete pacientes mais jovens (Gockley *et al.*, 2014).

A apresentação clínica dos LMS não difere dos outros tipos de tumores uterinos. As pacientes podem apresentar sangramento vaginal anormal, dor pélvica e abdominal. Geralmente se apresenta como uma massa uterina ao ultrassom ou Ressonância Magnética. Dificilmente pode se afirmar com clareza a presença de um LMS por método de imagem, mesmo utilizando metodologias mais sensíveis e específicas como Ressonância Magnética, Tomografia Computadorizada e Ultrassonografia com Doppler. A massa e as características morfológicas do tumor se parecem muito com as de um leiomioma, tornando a técnica de Ressonância Magnética apenas um complemento da conduta cirúrgica (Seagle *et al.*, 2017).

A quimioterapia adjuvante geralmente é recomendada para todos os estágios da doença. O método cirúrgico continua sendo a técnica de escolha para o controle do LMS, pouco se sabe sobre os efeitos da dissecação

linfonodal durante o ato da cirurgia, já que a metástase linfonodal é pouco frequente nessas pacientes (Lin *et al.*, 2016; Seagle *et al.*, 2017).

Quanto às características moleculares, os LMS podem apresentar mutações nas vias de sinalização do *IFN γ* , tendo como alvos *JAK1*, *STAT1* e *PSMB9 β li*. Podem também apresentar hiperexpressão de genes como *BCL-2*, ou baixa expressão de *KI-67*, *p53*, *p16*, *TWIST1*, *BRCA1* e *MED12* (Hayashi *et al.*, 2016).

1.1.2. Sarcomas do Estroma Endometrial

Os sarcomas do estroma endometrial (SEE) representam cerca de 10% de todos os tumores uterinos e representam atualmente 2% dos sarcomas uterinos. A nomenclatura dos tumores de estroma endometrial foi introduzida em 1966 por Norris e Taylor. De acordo com a classificação da *World Health Organization* (WHO, 2003), o tumor do estroma endometrial é composto por células que se assemelham às células do endométrio proliferativo. Os SEEs passaram a ser divididos em 4 categorias pela WHO em 2014, incluindo nódulo do estroma endometrial (NEE); sarcoma do estroma endometrial de baixo grau (SEE-BG); sarcoma do estroma endometrial de alto grau (SEE-AG) e sarcoma uterino indiferenciado (SUI). O SEE-BG representa o segundo tumor mesenquimal mais comum do útero, ficando atrás somente dos LMS (Norris & Taylor, 1966; WHO, 2003; WHO 2014; Horng *et al.*, 2016).

O SEE pode apresentar algumas características moleculares interessantes, por exemplo, o rearranjo cromossomal que leva à junção de dois genes: *JAZF1* e *JJAZ1* t(7;17)(p15;q21); a frequência deste tipo de mutação é de 50% nos SEE-BG e nos NEE, outra característica é a fusão dos genes

JAZF1 e *PHF1* t(6;7)(p21;p15). Uma alteração genética menos frequente também foi reportada nos SEE-BG, a junção dos genes *PHF1* e *EPC1* t(6;10)(p21;p11) (Micci *et al.*, 2016).

A apresentação clínica dos SEEs é a mesma já descrita anteriormente para os LMS. O procedimento padrão para tratamento e estadiamento dos SEEs é histerectomia total e salpingo-ooforectomia bilateral com exploração das cavidades abdominais e peritoneais. Alguns pesquisadores sugerem que a imagem pré-operatória seja obrigatória, pois os SEEs têm uma tendência metastática para pulmões e região peritoneal. Um grupo de pesquisa envolvendo 22 pacientes diagnosticadas com SEEs, identificou que 75% foram diagnosticadas erroneamente com leiomiomas. Uma pesquisa radiológica completa de tórax, pelve e abdômen poderia ter evitado tal equívoco no diagnóstico. Os SEEs podem se apresentar como massa heterogênea com múltiplos cistos degenerados na ultrassonografia e metástases à distância confirmadas por tomografias em pelve e abdômen. Os SEE-AG geralmente apresentam invasão miometrial e invasão dos linfonodos (Segae *et al.* 2004; Amant *et al.* 2009; D'Angelo & Prat. 2010; Amant 2010; Li e Teng, 2016; Micci *et al.*, 2016).

1.1.3. Adenossarcoma

Os adenossarcomas (ADS) foram descritos primeiramente por Clement e Scully em 1974, são compostos por componente epitelial atípico e um componente sarcomatoso. Os adenossarcomas surgem no endométrio em 70% dos casos e também podem ser encontrados no miométrio, região do cérvix, ovários, trompas e regiões extrauterinas. Representam cerca de 5% de

todos os sarcomas uterinos e apenas 0.2% de todos os tumores nesse órgão, sendo a forma mais rara. Este tipo tumoral é composto por um componente epitelial benigno e um componente mesenquimal maligno. Os ADS possuem uma sobrevida global de 80% em 5 anos, apesar da alta sobrevida, a recorrência tumoral é de 30 - 45% (Clement & Scully, 1974; Zaloudek & Norris, 1981; Nathenson *et al.*, 2016).

Os ADS foram descritos como tumores de pacientes com idade mais avançada, surgindo na média dos 70 anos. Porém, posteriormente vários estudos demonstraram média de idade na faixa dos 55 anos. Geralmente apresentam clínica de sangramento, dor abdominal, pélvica e são caracterizados por um crescimento lento. A apresentação na imagem por ultrassonografia e ressonância magnética é de uma massa homogênea. Não se pode afirmar com clareza seu diagnóstico por imagem, a representação da imagem é fator crucial para prognóstico e conduta pré-operatória (Nathenson *et al.*, 2016).

Acredita-se que a endometriose seja fator de risco para os ADS. No entanto esta teoria não foi comprovada. Outro fator de risco para o desenvolvimento desses tumores seriam o uso prévio de tamoxifeno ou outros moduladores do receptor do estrogênio e a radiação pélvica ionizante (Yang *et al.*, 2015).

As mutações mais comumente encontradas nos ADS são nos genes *PTEN*, *PIK3*, *MDM2*, *CDK4*, *RB1* e *TP53*. Apesar de serem genes importantes, envolvidos em reparo do DNA e sinalização celular, não se sabe ainda a importância das mutações nestes genes, na biologia do tumor e suas possíveis aplicações terapêuticas.

Recente estudo descreveu alterações genéticas muito importantes nos ADS, alterações nos números de cópias em genes como, *CDK4*, *MDM2*, *GNAS*, *SGK1* e *DICER1*, muitos destes genes possuem papel importante na regulação e manutenção do DNA (Blom e Guerrieri, 1999; Hodgson *et al*, 2017).

1.1.4. Carcinossarcomas

Também denominados tumores mullerianos mistos malignos (TMMM), são tumores agressivos e raros, compostos por elementos epiteliais e mesenquimais de origem monoclonal. A doença extrauterina pode ser encontrada em 60% dos casos e os níveis de recorrências para esses tumores se encontram na casa dos 50%, independente de tratamento cirúrgico ou terapia adjuvante (Cantrell *et al.*, 2015). Esse tumor apresenta baixa expressão gênica e protéica de *TGF-B*, *p16*, *p53*, *ERB*, *CATs*, e *VEGF*; expressão moderada de *HER-2* e *PTEN*, e baixa expressão ou ausência de RE (receptor de estrogênio), PR (receptor de progesterona), IGFR e CD10 (Kobayashi *et al.*, 2013).

Os carcinossarcomas (CCS) uterinos correspondem a 4.3% de todas as neoplasias uterinas e são estadiados juntamente com os carcinomas de endométrio. A incidência anual é de 0.5 - 3.3 casos para cada 100 mil mulheres. Sabe-se que os contraceptivos orais podem representar um fator de proteção e os fatores de risco incluem níveis elevados de estrogênio, obesidade, nuliparidade, uso de tamoxifeno e radioterapia pélvica prévia (Kanthan *et al.*, 2010).

As características moleculares dos CCS não são bem compreendidas; possuem alta instabilidade cromossomal e cariótipo complexo. As mutações mais comuns são reportadas nos genes *TP53*, *PTEN*, *PI3K/AKT/MTOR*, *KRAS*, *PARP1*, *VEGF*, *COX2* (Bashir *et al.*, 2014; Cantrell *et al.*, 2015).

As características clínicas dos CCS são similares aos de outros sarcomas uterinos. As pacientes geralmente estão na pós menopausa e apresentam sangramento uterino anormal, dor abdominal e aumento das dimensões uterinas. Mulheres com CCS geralmente apresentam uma massa endometrial ou massa protruindo da cérvix uterina. É comum pacientes com CCS apresentarem doença extrauterina. Assim, exames como a Ressonância Magnética e a Tomografia Computadorizada podem ajudar no acompanhamento da paciente e uma conduta cirúrgica mais adequada. Por outro lado, não existem dados que suportem a eficácia dos exames de imagem no pré-operatório. Estudos mostraram que níveis elevados de CA125 podem estar associados com doença extrauterina, e altos níveis de CA125 no pós-operatório estão associados com baixa sobrevida (Huang *et al.*, 2007; Thomakos *et al.*, 2013).

1.2. Etiologia

Algumas evidências indicam que a exposição prévia à radiação pode aumentar o risco de desenvolver sarcomas. A radiação pélvica foi identificada como fator de risco para o desenvolvimento destes tumores, bem como a obesidade, hipertensão, diabetes e exposição ao estrogênio, principalmente em pacientes com CCS e SEE (D'angelo e Prat, 2010; Almeida *et al.*, 2014). Associação com uso de tamoxifeno, uso de estrogênio e outras condições, tais

como ovários policísticos também foram observados em pacientes com SEE (Kobayashi *et al.*, 2013).

Outro aspecto importante a ser considerado são as características moleculares desses tumores. Os SEEs apresentam mutações somáticas específicas. Já nos LMS, foram observadas mutações e hiperexpressão de genes envolvidos no controle do ciclo celular. Alguns autores acreditam na hipótese de que parte dos LMS (0,1 – 1%,) possa se originar a partir de um leiomioma degenerado. Os fatores genéticos parecem desempenhar um papel importante, já que a incidência dos sarcomas, em geral, é duas vezes maior entre as mulheres negras, em relação às mulheres brancas (Toro *et al.*, 2006; Perot *et al.*, 2012; Cuppens *et al.*, 2015).

Um dos maiores estudos envolvendo sarcomas uterinos reuniu dados de outros estudos importantes e confirmou que mulheres afrodescendentes têm maiores chances de desenvolver sarcomas uterinos em geral, assim como obesidade e tendência ou presença de diabetes. Como já mencionado anteriormente, a exposição externa ao estrogênio, características reprodutivas, menstruais e tabagismo também foram apontados como facilitadores para desenvolvimento dos sarcomas. Por outro lado, foi observado que quanto maior for a idade de entrada na menopausa, menor é o risco associado ao desenvolvimento dos sarcomas uterinos (Felix *et al.*, 2013).

1.3. Prognóstico e Tratamento

O prognóstico das pacientes com sarcoma uterino não mudou nas últimas duas décadas, e a sobrevida global em 5 anos varia entre 17,5% e 54,7%, em vários estudos. Numa série de 100 casos, as taxas de sobrevida

global em 2, 5 e 10 anos foram de 62%, 51%, e 38%, respectivamente (Prat, 2009; Cuppenset *al.*, 2015).

A média de idade observada para as pacientes acometidas de modo geral é de, aproximadamente, 51 anos para SEE; 57 anos para LMS; 59 anos para SUI e 66 anos para ADS (Amant *et al.*, 2009; Tropé *et al.*, 2012).

A cirurgia é o principal método terapêutico para os tumores mesenquimais do útero. Em pacientes jovens um ou ambos os ovários podem ser preservados, evitando-se, os efeitos deletérios da privação hormonal, excetuando os casos de CCS e SEE, onde as metástases nas regiões anexiais são frequentes. Na presença de tumor localmente avançado e sem doença à distância, seja no momento do diagnóstico ou na recidiva, pode ser realizada a exenteração pélvica. Os SEE são hormônio dependentes, o procedimento cirúrgico obrigatório é a salpingooforectomia. (Reidet *al.*, 1989; Mancari *et al.*, 2014).

1.4. Alterações genéticas comumente relacionadas ao surgimento dos sarcomas uterinos

Várias alterações genéticas têm sido associadas ao surgimento dos sarcomas uterinos. Mutações, translocações e deleções, são descritas para os diversos tipos histológicos. Sabe-se que o SEE é caracterizado pela translocação cromossômica t (07;17) (p15; Q21), resultando na justaposição de 7p15 e 17q21 originando a fusão dos genes *JAZF1/JJAZ1*, os tipos histológicos que apresentam esta alteração são os SEE-BG e NEE, como já mencionado anteriormente. Os SEEs são um grupo geneticamente heterogêneo de tumores que abrigam translocações cromossômicas recorrentes, produzindo rearranjos

de genes específicos. A imunoistoquímica pode auxiliar significativamente na distinção dos tumores do estroma do endométrio com o painel de marcadores comumente utilizado: CD10, desmina, receptor de estrogênio (RE) e receptor de progesterona (RP) (Seddon e Davda, 2011; World Health 2014).

Os SEEs possuem diversos rearranjos cromossômicos, perda de heterozigose de importantes genes supressores de tumor e desregulação da via do WNT (Chiang & Oliva, 2011).

Em contraste, os LMS não são caracterizados por uma translocação cromossômica específica, mas sim associados a um complexo cariótipo com inúmeros ganhos e perdas cromossômicas, como a deleção do cromossomo 1 por exemplo. A maioria dos LMS expressa o receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas-alfa (PDGFR- α), o gene do tumor de Wilms (WT1), aromatase e receptor do hormônio liberador de gonadotrofinas (GNRH-R) (Amant *et al.*, 2009; Seddon e Davda, 2011). A perda da função do *BRCA1* e *MED12*, genes supressores de tumor, assim como, perda da expressão de LMP2 (um interferon) já foram associadas ao desenvolvimento do LMS. Mutações nos genes *TP53*, *ATRX* e *MED12* também foram reportadas em um recente estudo, utilizando técnicas de sequenciamento de nova geração.

Adicionalmente, nos LMS, é frequente a perda de expressão dos receptores do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e do receptor do fator de crescimento epidérmico 2 (ERBB2) HER2 (Amant *et al.*, 2009; Kobayashi *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2015; Latteyer *et al.*, 2016).

Em CCS também foram descritas mutações somáticas, com baixa frequência, nos genes da família do fator de crescimento tirosina-quinase e nos seus alvos (*AKT* e *EGFR1* e 2; *ER/PR*; *IGF1* e 2). Mutações nestes genes

foram identificadas como biomarcadores no tratamento de CCS com pequenas moléculas inibidoras ou anticorpos monoclonais contra o receptor do fator de crescimento específico. Mutações em *KRAS*, *PIK3CA*, *PARP 1* e *COX-2* também foram descritas nos CCS, com grande heterogeneidade entre eles. Todos os CCS apresentaram pelo menos 1 mutação (Kobayashi et al., 2013; Mcconechy et al., 2015).

1.5. Sequenciamento de Nova Geração (SNG) na identificação de alterações genéticas nos sarcomas e carcinossarcomas uterinos

De modo geral, os tumores são causados por mutações, deleções ou amplificações em genes que atuam em diversas vias bioquímicas e regulatórias. Nas duas últimas décadas houve uma grande evolução nos campos da biologia molecular e os pesquisadores passaram a entender que os tumores podem adquirir características e propriedades diferentes uns dos outros, podendo tornar-se cada vez mais heterogêneos. No intuito de superar essas barreiras, novas tecnologias foram desenvolvidas, tanto para análise de dados relacionados aos tipos tumorais, como para seu armazenamento. As tecnologias de Sequenciamento de Nova Geração (SNG) foram pensadas para suprir uma demanda de informações e dados crescentes, cada vez mais complexas e úteis no diagnóstico e na pesquisa (Buermans & denDunnen, 2014).

O primeiro método de Sequenciamento foi utilizado por mais de 30 anos. O método de Sanger foi o mais utilizado e reproduzido mundialmente, ainda hoje algumas técnicas de avaliação são realizadas utilizando seu princípio de terminação da cadeia polinucleotídica. As tecnologias de SNG permitem

investigar exomas, genomas ou transcriptomas de diferentes organismos em um tempo relativamente curto. Além disso, é possível utilizar de painéis genéticos confeccionados utilizando *amplicons* de interesse, sejam eles relacionados à carcinogênese ou não. Uma grande vantagem dos painéis é que eles podem ser customizados para atender a demanda do pesquisador ou à diagnósticos específicos (Bahassi & Peter, 2014; Yadav *et al.*, 2014; Muzzey *et al.*, 2015).

As aplicações do SNG são variadas e utilizadas em muitos campos relacionados com as ciências biológicas. A técnica também fornece ferramentas para estudos de biologia comparativa através do sequenciamento de todo genoma, de uma variedade de organismos. O SNG é aplicado nos domínios da saúde pública e da epidemiologia através do sequenciamento de espécies bacterianas e virais para identificação de novos fatores de virulência. Além disso, podemos utilizar o SNG para realizar estudos de expressão gênica usando RNA-Seq (SNG de RNA), fornecendo aos pesquisadores e clínicos a capacidade de visualizar a expressão de RNA's e suas sequências.

Essas são apenas algumas das aplicações que o SNG pode oferecer ao pesquisador e ao clínico. À medida que a técnica continua a crescer em popularidade, é inevitável que surjam novas aplicações e variações das tecnologias (Grada e Weinbrecht, 2013; Latteyer *et al.*, 2016).

O SNG promete fornecer uma visão sobre a função do gene, ou sua regulação, e isso levou há um número crescente de variações metodológicas e de sistemas de diferentes empresas. Esta tecnologia aumentou o rendimento no amplo campo da biologia molecular e suas aplicações, resultando em altas

demandas de amostras, menor tempo de corrida e melhor qualidade dos dados (Endrullat *et al.*, 2016).

Atualmente, o diagnóstico molecular para pacientes com câncer antes de estabelecer o curso do tratamento está se tornando uma presença comum na prática clínica. Consequentemente o sequenciamento de ácidos nucleicos tornou-se parte fundamental do diagnóstico e tratamento, fornecendo informações muito importantes para avaliação do curso da doença. Uma série de painéis genéticos já foi aprovada pelo FDA (*Food and Drug Administration*) como método diagnóstico confiável e atualmente estão disponíveis para conduta clínica (Ong *et al.*, 2014; Gray & Dunlop & Elliot, 2014; Endrullat *et al.*, 2016).

Estamos na era da genômica individual e nada melhor que desenvolver um aparelho capaz de ser o sequenciador pessoal do genoma. A tecnologia *IonTorrent* criada em 2011, pela empresa *Life Technologies*, e utilizada aqui em nosso trabalho, possui a capacidade de sequenciar o genoma em larga escala a partir da diferença de concentração de íons de Hidrogênio (Figura 1). Uma outra alternativa comercial seria o sistema estabelecido pela empresa *Illumina* que utilizou como metodologia, os padrões de identificação de mutações por emissão de fluorescência (Eijkelenboom *et al.*, 2016; Pruitt, 2016).

Até o momento existem poucos artigos disponíveis na literatura relacionados ao SNG em sarcomas e carcinossarcomas uterinos. Em um desses estudos foi realizado o sequenciamento do exoma total de 19 amostras de LMS e foram reportadas 43 mutações. As mutações mais comuns foram nos genes *TP53*, em 6 casos; *ATRX*, em 5 casos; no *MED12*, em 4 casos. As mutações em *TP53* já haviam sido previamente descritas e sugerem sua

participação na patogênese dos LMS. As mutações encontradas no gene *MED12* ocorreram no exon 2, outro ponto de mutação já conhecido e primeiramente descritas nos leiomiomas uterinos. Esses dados poderiam reforçar a hipótese de que alguns LMS se originariam de leiomiomas degenerados (Mäkinen *et al.*, 2016).

Nos SEE, utilizando SNG para análise do exoma total foram reportadas mutações nos genes *PTEN*, *RB1*, *TP53* e *CDH1*. Porém apenas 3 amostras de SEE-BG foram analisadas, embora estas mutações possam contribuir para a patogênese dos SEEs, um número de amostras maior seria necessário para confirmar esses achados (Choi *et al.*, 2015).

Figura 1 – Figura esquemática apresentando as etapas e os princípios da técnica de Sequenciamento de Nova Geração utilizada em nosso estudo Adaptada de: genomics.cn/en/navigation (*Ion Torrent Workflow*)

Outro estudo utilizando amostras de CCS observou mutações em 27 de 30 tumores. As mutações mais frequentes foram nos genes *TP53*, *PI3K*, *FBXW7*, *KRAS* e *CSMD3*. As mutações em *TP53* e *PI3K* foram observadas nos tumores primários e nas metástases, tanto no componente sarcomatoso quanto no carcinomatoso. Esses resultados indicam que as mutações podem estar presentes desde o início da tumorigenese (McConechy *et al.*, 2015).

Até o presente momento, pouco se sabe sobre a fisiopatologia e os mecanismos moleculares envolvidos na patogenia dos sarcomas uterinos. Uma vez que se trata de tumores raros, poucos estudos foram realizados focando nas características genéticas comuns entre os diferentes tipos histológicos ou naquelas específicas de cada subtipo. Assim sendo, seria de suma importância a realização de estudos que buscassem auxiliar no seu melhor entendimento, visando a descoberta de novos marcadores para fins de diagnóstico, prognóstico e preditores de tratamento para essas neoplasias. Com base nisso e no exposto anteriormente, nos propusemos a investigar um painel (*Comprehensive cancer panel*) da *Thermo Fisher Scientific* contendo 409 genes já reportados na literatura como relacionados à carcinogênese, em amostras parafinadas de pacientes com LMS, CCS, ADS e SEE.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

- Contribuir com a definição do catalogo de mutações de genes envolvidos no processo de carcinogênese, em amostras de carcinossarcoma e sarcomas de corpo uterino.

2.2. Específicos

- Avaliar a sequência nucleotídica de 409 genes envolvidos em diversos processos biológicos cuja desregulação pode levar a formação de tumores, em amostras parafinadas de leiomiossarcomas, sarcomas do estroma endometrial, adenossarcoma e carcinossarcoma uterinos;
- Avaliar a associação entre as mutações encontradas e os dados clínicos e anatomopatológicos das pacientes.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1. Seleção das amostras

Foram selecionados 66 casos com diagnóstico de sarcomas uterinos, (incluindo: vinte e dois leiomiossarcomas, dezesseis sarcomas de estroma endometrial, 3 sarcomas indiferenciados, 2 adenossarcomas e vinte e três carcinossarcomas). Foram utilizadas amostras obtidas de pacientes através de cirurgia, no período de 2000 a 2012. Os tecidos parafinados foram cedidos pelo Hospital Santa Marcelina, Instituto Brasileiro de Controle do Câncer e Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP). O presente projeto foi aprovado pelas comissões de ética de todas as instituições envolvidas, incluindo o Comitê de ética e pesquisa da Faculdade de medicina da universidade de São Paulo (CEPFMUSP) (477/15, ANEXO A).

Os prontuários das pacientes foram analisados e foram coletados dados como: idade ao diagnóstico, presença de sangramento pós-menopausa, uso de anticoncepcional oral, terapia de reposição hormonal, tabagismo, tipo de cirurgia realizada, tratamento adjuvante e presença de metástase ou recidiva.

3.2. Extração e quantificação do DNA

A extração de DNA foi realizada utilizando 15 cortes, de 3µm cada, de todos os casos incluídos no estudo. Os cortes foram depositados diretamente em microtubos de 1,5mL. Adicionou-se 1mL de xilol e as amostras foram agitadas por vortex e centrifugadas em velocidade máxima de 14.500 rpm por 2 minutos. Removeu-se o sobrenadante e suspendeu-se o pellet com 1mL de etanol absoluto, a amostra foi homogeneizada e centrifugou a velocidade

máxima de 14.500 rpm por 2 minutos. O sobrenadante foi removido e manteve-se o tubo aberto para evaporação do etanol residual por 10 minutos a temperatura ambiente. O precipitado foi ressuspendido e adicionado 150µL do Buffer PKD e o tubo foi invertido manualmente e adicionou-se 10µL de proteínase K e agitou-se por vortex. As amostras foram incubadas por 56°C por 15 minutos e incubadas no gelo logo após, por 3 minutos. Após o processo de incubação, a amostra foi centrifugada por 15 minutos a 14.000 rpm e descartou-se o sobrenadante.

Para o processo de purificação de DNA genômico o precipitado foi ressuspendido em 180µL do Buffer ATL e adicionou-se 40µL de proteínase K e agitou-se por vortex. O DNA foi incubado á 56°C por 1 hora e depois á 90°C por 2 horas.

O material foi centrifugado brevemente e aguardou-se sua estabilização a temperatura ambiente. Adicionou-se então 4µL de RNase A para degradar o RNA restante das etapas anteriores. Foram adicionados 200µL do Buffer AL e 200µL de etanol absoluto e a amostra foi homogeneizada brevemente.

Para cada amostra processada, foi utilizada uma coluna depositada em um tubo suporte de 2mL. Todo o material foi transferido para a coluna, para nova centrifugação a 14.000 rpm por 1 minuto a temperatura ambiente. O filtrado foi descartado e adicionou-se 700µL da solução de lavagem 1X (preparado com etanol) à coluna, com nova centrifugação a 14.000 rpm por 15 segundos a temperatura ambiente. O filtrado foi descartado e adicionou-se 700µL de uma segunda solução de lavagem 1X (preparado com etanol) à coluna, com nova centrifugação a 14.000 rpm por 15 segundos. O filtrado foi descartado e adicionou-se 700µL de etanol à coluna, com nova centrifugação a

14.000 rpm por 15 segundos. A coluna foi colocada em um novo tubo suporte de 2.0 mL, a tampa foi aberta e houve nova centrifugação a 14.000 por 5 minutos para secagem da coluna. A coluna foi transferida para novo tubo de coleta de 1,5 mL e adicionou-se 30 μ L de solução de eluição para recuperar o DNA da resina. Seguiu-se nova centrifugação a velocidade máxima por 1 minuto a temperatura ambiente e a coluna foi removida e descartada. O microtubo final contendo o DNA extraído foi armazenado a -20°C.

Para quantificação do material, 1 μ L do eluído de DNA, foi submetido à leitura de concentração em nanogramas (ng) e determinação das razões que indicam sua pureza (260/280 e 260/230) em espectrofotômetro tipo NanoDrop (*ThermoScientific*). Os valores obtidos estavam acima de 1,8 para as razões 260/280 e 260/230, e as concentrações acima de 70ng/ μ L.

3.3. Quantificação do material genético em Fluorímetro

Para obtermos uma melhor acurácia na quantificação das amostras foi utilizado *QuantiFluor* (*Promega*) que permite a identificação de DNA dupla fita nas amostras. Preparou-se o *Quantifluor Work Solution* em um tubo de 5 mL, composto por TE (1X) e 10 μ L de Quantifluor. O padrão foi preparado em um tubo de 0.5mL, composto por 2 μ L do padrão e 98 μ L de TE (1X). O branco foi preparado em um tubo de 0,5mL, composto por 100 μ L de TE (1X) e 100 μ L de *Quantifluor Work Solution*. Foi realizado então a calibração do dispositivo utilizando *Quantifluor Work Solution* e Solução Padrão. Quanto ao preparo da amostra utilizou-se 99 μ L de TE (1X), 100 μ L de *Quantifluor Work Solution* e 1 μ L da amostra. Incubou-se então por 5 minutos a temperatura ambiente e protegida da exposição à luz.

3.4. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para análise do perfil de amplificação do DNA obtido, foi realizada a técnica de reação em cadeia da polimerase (tabelas 2 e 3). O DNA genômico foi descongelado em gelo. Água livre de DNase foi descongelada em gelo, a solução de PCR 10X (sem magnésio), os dNTPs, o 50mM MgCl (magnésio) e os oligonucleotídeos iniciadores senso e anti-senso. Preparou-se a reação de PCR conforme a Tabela 3. Programou-se o termociclador de acordo com a Tabela 4.

Tabela 2 - Componentes da reação de PCR convencional utilizada para verificar a qualidade das amostras (integridade)

COMPONENTES	VOLUME (20µl)
	2µl
10X tampão de PCR (s/ magnésio)	0.4µl
10 Mm mix DNTps	0.6µl
50 Mm MgCl	0.2µl
<i>Iniciador sense</i>	0.2µl
<i>Iniciador anti-sense</i>	20ng
DNA	0.08µl
<i>Taq DNA polimerase Platinum</i>	20µ
Água livre de DNase e RNase	

Fonte: *ThermoFischer*

Tabela 3 - Condições de ciclagens utilizadas nas reações de PCR convencional (Veritti) para avaliar a fragmentação do material genético obtido

CICLAGEM					
Denaturação final inicial	40 ciclos sequenciais			Extensão	
95°C	95°C	55°C	72°C	72°C	4°C
5min	1min	2min	1min	7min	∞

Fonte: *ThermoFischer*

3.5. Reação de sequenciamento de nova geração (SNG)

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

Inicialmente, para a construção das bibliotecas, utilizamos 3 amostras de DNA tumoral de sarcoma uterino, provenientes de amostras FFPE (*Formalin-Fixed Paraffin-Embedded*) e um painel pequeno de 14 genes customizado, de 7 kb, para verificarmos se os DNAs estavam com qualidade adequada ao preparo de bibliotecas e sequenciamento, seguindo as instruções do fabricante. Após verificarmos que as amostras estavam com qualidade adequada, seguimos para a construção de bibliotecas com o *IonAmpliSeq™ Comprehensive Cancer Panel* (ThermoFisher Scientific), um painel comercial de 1300 kb que abrange 409 genes relacionados ao câncer, com 16000 pares de oligonucleotídeos iniciadores distribuídos em 4 *pools*. O protocolo *IonAmpliSeq Library Preparation* (ThermoFisher Scientific) foi seguido e utilizamos os reagentes do *Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0* no preparo das

bibliotecas, com 10 ng de DNA (quantificação feita no *Qubit Fluorometric Quantitation*, Thermo Fisher Scientific) por *pool* de iniciadores, totalizando 40 ng de DNA de cada amostra. Os *amplicons* gerados foram tratados com a enzima FuPa para os iniciadores serem parcialmente digeridos, e em seguida os adaptadores P1 e A juntamente com *barcodes* foram ligados pela enzima Ligase aos *amplicons*, que depois foram então, purificados por *beads* magnéticas (AgencourtAMPure XP - BeckmanCoulter).

Seguiu-se com a etapa de amplificação da biblioteca com reação de PCR em emulsão utilizando *Ion PI™ Hi-Q™ OT2 200 Kit* (ThermoFisher Scientific), na qual ocorre a amplificação clonal dos fragmentos no interior de milhares de micelas geradas nesta solução. O sequenciamento foi então realizado com *Ion PI™ Hi-Q™ Sequencing* (ThermoFisher Scientific), segundo as orientações do fabricante, e as reações foram depositadas em um *Ion PI™ Chip*, possibilitando obter uma quantidade de dados de cerca de 10 Gb.

O sequenciamento é baseado na liberação cíclica dos nucleotídeos em uma ordem conhecida e a incorporação de cada nucleotídeo na cadeia crescente por ligação fosfodiéster libera uma molécula de hidrogênio, modificando o pH da solução. A detecção de alterações no pH da solução, a cada ciclo do sequenciamento que permite a identificação da sequência de bases.

Os resultados do sequenciamento foram analisados no *TorrentSuite software v5.0.5* e *Variant Caller* (IonTorrent – Life Technologies) e comparados com a versão do genoma GRCh37/HG19. Os arquivos *Variant Call Format* (VCFs) são arquivos que contém os resultados das corridas de sequenciamento e foram importados para o software *VarSeq* (Golden Helix)

para anotações adicionais e filtragem de variantes encontradas nas corridas de sequenciamento. As variantes identificadas foram filtradas seguindo os seguintes critérios de qualidade e frequência: cobertura da base >100, qualidade do genótipo >50; base variante presente em pelo menos 5% das leituras; base variante presente em pelo menos 2 leituras em cada sentido, HRUN (número de bases sequenciais iguais– região de homopolímero) <5; ausência da variante em bancos de dados populacionais (ExAC; NHLBI-ESP; 1000Genomes) ou *minor allele frequency* (MAF) $\leq 0,01$.

Com o objetivo de excluir possíveis variantes germinativas, foram excluídas as variantes com frequência entre 40-65% e descritas no dbSNP. Posteriormente, as variantes foram selecionadas de acordo com seu efeito na proteína, sendo consideradas apenas: 1) variantes descritas no banco de dados COSMIC; ou 2) variantes classificadas como perda de função (LoF – *loss of function*) (variantes do tipo *frameshift*, ganho ou perda de códon de parada, alteração em sítio de splice), ou 3) variantes *missense* (deleção ou inserção *inframe*, troca de aminoácido) preditas como possivelmente patogênicas em pelo menos três dos seis programas de predição utilizados (SIFT, PolyPhen, MutationTaster, Mutation Assessor, FATHMM, FATHMM MKL) e ocorrendo em genes classificados como oncogenes ou genes supressores de tumor no banco de dados *OncoMD*.

3.6. Análise Estatística

Todos os testes foram realizados utilizando os softwares SPSS 13.0 e o GraphPadPrism 5.0. Como parâmetros clínicos foram considerados: a idade,

estado menopausal, paridade, tabagismo, uso de anticoncepcional oral ou terapia de reposição hormonal e patologia de base associada.

Quanto aos parâmetros histopatológicos serão avaliados: estadio do tumor, tipo histológico, grau histológico, profundidade de invasão miometrial, invasão linfovascular, risco de metástase e sobrevida.

4. RESULTADOS

As 66 amostras embebidas em parafina selecionadas para o estudo foram submetidas às extrações de DNA. Inicialmente, a quantificação do material genético obtido foi realizada em espectrofotômetro comum do tipo NanoDrop (ThermoScientific). Porém, apesar de ser o método mais utilizado para verificar a concentração e a pureza do material genético, o NanoDrop superestima a quantidade em pelo menos 6 vezes e não é capaz de ler exclusivamente DNA dupla fita, podendo resultar em resultados falsos. Para evitar vieses na quantificação das amostras, repetimos a verificação das concentrações do DNA total, utilizando o aparelho Quantifluor® (Promega) que permite visualizar apenas DNA dupla fita, garantindo assim maior controle das análises. Na Figura 2 pode ser visualizada a distribuição das amostras processadas e sua frequência de acordo com o seu tipo histológico. Nessa etapa, observamos que a grande maioria das amostras apresentava perfil e concentração adequados para prosseguimento dos experimentos.

Na Tabela 4 estão apresentados os perfis de rendimento das extrações utilizando tanto o Nano Drop quanto o Quantifluor. Também pode-se observar as concentrações em ng/μl avaliadas pelas duas técnicas de leitura e as razões que indicam possíveis contaminações por sais, proteínas e RNA (260/280 e 260/230). O mínimo necessário para as reações de sequenciamento utilizando a plataforma *IonTorrent da ThermoFischer* seria de 20ng/μl de DNA por caso.

Somente para avaliar o perfil de fragmentação e o potencial de amplificação do material genético obtido, realizamos uma reação de PCR convencional, na qual observamos amplificação dos fragmentos em apenas

algumas amostras. Esse resultado era esperado devido à natureza do material parafinado, que já se sabe se apresenta altamente fragmentado.

Figura 2 - Distribuição global das amostras incluídas no trabalho e que foram processadas, de acordo com seus subtipos histológicos. Carcinossarcomas 35%, Leiomiossarcomas 34%, Adenossarcoma 3%, Sarcomas do Estroma Endometrial de Alto Grau 15%, Sarcoma do Estroma Endometrial de Baixo Grau 8%, Sarcoma Indiferenciado 5%

A maioria das amostras apresentou perfil adequado para prosseguimento dos experimentos. O mínimo necessário para as reações de sequenciamento utilizando a plataforma *IonTorrent da ThermoFischer* é de 20ng/μl. O perfil de concentração das amostras é representado na tabela 4, onde podemos observar as concentrações em ng/μl das duas técnicas e as razões de contaminação de sais e proteínas (260/280 e 260/230).

A reação de PCR mostrou amplificação dos fragmentos do DNA em apenas algumas amostras. Esses resultados eram esperados devido a natureza do material parafinado, que se apresenta altamente fragmentado. Para realizar as reações de sequenciamento, o DNA necessita estar fragmentado, utilizando um protocolo controlado e otimizado, para aumentar a eficiência da reação.

Tabela 4 - Comparação entre os resultados das quantificações realizadas no Quantifluor e NanoDrop para cada amostra de DNA

Amostras	Concentração – Quantifluor (ng/μL)	Concentração – Nanodrop (ng/μL)	260/280	260/230
ADS1	96	386.2	1.84	2.11
ADS2	17	239.4	1.71	1.86
CCS1	7.5	206.9	1.83	1.29
CCS10	6.2	123.9	1.71	1.61
CCS11	2.13	171.1	1.89	1.68
CCS12	45	260.2	1.88	2.35
CCS13	62	343.2	1.85	2.12
CCS14	18	170.8	1.85	1.92
CCS15	64	516	1.87	1.80
CCS16	3.98	87.5	1.81	1.41
CCS18	0.0782	124.8	1.81	1.16
CCS19	145	530.8	1.85	2.26
CCS2	40	207.9	1.86	1.78
CCS20	114	2030.2	1.88	2.15
CCS22	18	206.1	1.83	1.92
CCS23	22	304.1	1.78	1.65
CCS24	61	523	1.85	1.98
CCS3	62	624.7	1.80	2.03
CCS4	18	183.2	1.83	2.11
CCS5	117	457	1.87	1.84
CCS13*	101	372.2	1.84	2.32
CCS6	18	316.1	1.90	1.60
CCS7	8.6	114.9	1.79	1.79
CCS8	1.75	41.2	1.76	1.46
CCS9	52	380.5	1.83	1.92
LM201	*	*	*	*

(CONTINUA)

(CONCLUSÃO)

Amostras	Concentração – Quantifluor (ng/μL)	Concentração – Nanodrop (ng/μL)	260/280	260/230
LMS10	114	1293	1.87	2.11
LMS14	92	553.6	1.82	2.16
LMS38	120	524	1.85	2.34
LMS39	95	355.6	1.86	2.28
LMS40	0.482	892	1.86	2.16
LMS40	152	892	1.86	2.16
LMS42	157	1672.4	1.96	2.18
LMS43	56	392.9	1.73	1.91
LMS44	30	271.4	1.78	2.10
LMS45	16	88.3	1.86	1.74
LMS46	7	95.9	1.78	2.02
LMS47	23	98.7	1.83	2.20
LMS49	35	213	1.79	2.22
LMS50	63	397.3	1.86	2.24
LMS51	8.5	92.9	1.80	1.76
LMS52	13	386.3	1.92	1.63
LMS54	20	264.9	1.75	2.09
LMS55	111	161.6	1.79	1.81
LMS57	7.3	64.0	1.77	3.82
LMS58	7.5	193.6	1.86	1.57
LMS59	6.7	37	1.80	1.68
SEE1	93	397.3	1.82	2.18
SEE10	8.1	108	1.89	0.99
SEE11	13	293.9	1.75	1.99
SEE12	11	109.7	1.81	2.07
SEE13	1.99	30.5	1.80	0.93
SEE14	37	544	1.73	2.05
SEE15	2.15	34.2	1.82	0.69
SEE2	19	248.7	1.79	1.72
SEE3	26	253.1	1.94	2.10
SEE4	89	395.3	1.90	2.11
SEE5	34	220.9	1.83	2.09
SEE14*	100	356.6	1.82	2.19
SEE6	2.92	65.5	1.70	1.30
SEE7	158	745	1.84	2.19
SEE8	125	1422.9	1.94	2.09
SEE9	54	291.4	1.82	2.37
SI1	139	943	2.00	2.15
SI2	46	451.3	1.88	1.87
SI3	44	245	1.85	2.19

*ADS – adenossarcoma, CCS – carcinossarcoma, SEE – Sarcoma de Estroma Endometrial e LMS – Leiomiossarcoma. Amostras marcadas com * foram extraídas duas vezes. As amostras sombreadas não possuíam a concentração mínima necessária para serem incluídas nas reações de SNG

Em teoria, para realizar as reações de sequenciamento de nova geração o material genético necessita de fragmentação, porém a fragmentação necessita ser controlada e realizada com kits específicos. O perfil de fragmentação do DNA de nossas amostras permitiu pular a etapa de digestão indo direto para a etapa de clonagem. A princípio, dentre as 66 amostras 26 não possuíam concentração inicial adequada para o sequenciamento, mesmo após várias novas tentativas de extração (Tabela 4).

Na Figura 3 está apresentado o fluxograma que mostra cada etapa de processamento das amostras e as perdas sofridas em cada uma dessas etapas até chegarmos ao número final de 14 casos avaliados neste trabalho. A quantidade inicial que esperávamos avaliar eram pelo menos 32 amostras (8 amostras por chip, em 4 chips adquiridos), porém o número de perdas foi bem maior que o esperado.

Nesse estudo foram utilizados dois painéis: o *Comprehensive cancer panel* (contendo 409 genes cujas alterações são sabidamente envolvidas ou descritas em diversos tipos de cânceres) e o painel customizado pelo grupo da Dra. Dirce Maria Carraro (contendo 14 genes mais frequentemente mutados em tumores sólidos). O painel customizado foi inicialmente utilizado para aferição da qualidade das amostras, antes de iniciarmos as análises nos chips de interesse.

Figura 3 - Fluxograma das amostras incluídas no presente estudo. De 66 amostras iniciais, somente 14 se mantiveram até o final das análises. A grande maioria das perdas se deu na etapa de PCR multiplex, não permitindo que as amostras fossem incluídas nos chips (painéis) contendo os genes a serem avaliados

Para o painel de 14 genes, foram geradas em média 2.175.650 leituras mapeadas, resultando em 100% das bases alvo cobertas mais de 100 vezes em cada amostra. A homogeneidade dessas amostras variou entre 63 e 98%. A cobertura vertical (média por base) variou entre 18.908 e 39.071, o que significa que em média, as bases foram sequenciadas de 18 a 39 mil vezes.

Para o painel de 409 genes, foram geradas em média 16.543.982 leituras mapeadas para cada amostra, resultando em 75% das bases alvo cobertas mais de 100 vezes. A homogeneidade variou entre 46 e 86%. A cobertura vertical (média de leitura por base) variou entre 549 e 1.285. O valor ideal para homogeneidade das amostras deve ser acima de 80%. Para análise de mutações somáticas, é necessária uma cobertura vertical de 100x em pelo menos 90% dos alvos. Quando uma amostra está degradada ou comprometida, isso afeta a homogeneidade. Nós utilizamos as mesmas amostras nos dois painéis, e para melhor comparação e controle de qualidade, as amostras foram escolhidas aleatoriamente de acordo com a quantidade de material genético disponível e de diferentes subtipos histológicos.

Analisando o perfil das bibliotecas sequenciadas nesta primeira etapa, apresentado na Tabela 5 e 6, observa-se que a amostra 1 tem um perfil diferente das outras amostras, podemos observar isso na terceira coluna da tabela 6 (perfil da biblioteca), onde vemos os tamanhos dos fragmentos amplificados. Este perfil diferente pode ser observado tanto para o painel de 14 genes quanto para o painel de 409 genes.

Tabela 5 - Resultados do sequenciamento teste das amostras. Dados dos *reads*, dos índices de homogeneidade das amostras e qualidade da taxa de cobertura em 1x, 20x, 100x e 500x, em ambos painéis utilizados (14 e 409 genes). Amostras: 1- SEE1, 2-CCS19 e 3-LMS38

Amostra	Painel	Leituras mapeadas	Homogeneidade (%)	Cobertura média por base	Cobertura (%)			
					1x	20x	100x	500x
SEE1(1)	14 genes	1.514.116	63	18.908	100	100	100	94,78
CCS19(2)	14 genes	2.364.879	98	35.116	100	100	100	100
LMS39(3)	14 genes	2.647.955	98	39.071	100	100	100	100
SEE1(1)	409 genes	11.331.758	46	549.3	93,32	73,79	47,83	21,20
CCS19(2)	409 genes	21.554.257	86	1.285	99,73	98,20	94,18	70,03
LMS39(3)	409 genes	16.745.931	71	951.9	98,84	93,33	82,38	45,91

Tabela 6 - Análise do perfil das bibliotecas com os diferentes tamanhos de fragmentos sequenciados para cada uma das amostras, utilizando os dois painéis avaliados (14 e 409)

Amostra	Painel	Tamanho médio do fragmento	Perfil da biblioteca
SEE1(1)	14 genes	100
CCS19(2)	14 genes	128
LMS39(3)	14 genes	124
SEE1(1)	409 genes	89
CCS19(2)	409 genes	110
LMS39(3)	409 genes	102

Esses resultados podem ser explicados por uma possível degradação no DNA dessa amostra e os fragmentos maiores mostraram-se prejudicados na construção das bibliotecas, não tendo sido amplificados com sucesso. A degradação do material está diretamente relacionada com o tipo de material genético que foi extraído, visto que o processamento do tecido tumoral para a inclusão em material parafinado não controlado, ocasiona a quebra de DNA. Isso explica também a baixa homogeneidade de cobertura que essa amostra apresentou em relação às outras.

A partir dessas 3 amostras foram estabelecidas as condições para análise das demais amostras incluídas neste trabalho. Assim, após as reações de PCR multiplex iniciais foi observado que a maioria das amostras apresentava alto grau de degradação e presença de muitos artefatos genéticos. Como dito anteriormente, essas características se devem, muito provavelmente, ao processamento dos tecidos para inclusão em parafina. Devemos lembrar que como são tumores raros, muitas amostras são antigas e datam de quando ainda não havia preocupação em conservar o material para fins moleculares. Numa tentativa de minimizar o impacto desses problemas em nosso trabalho, foi utilizada um método para recuperação desses DNAs. A Figura 4 apresenta um gel representativo das reações de PCR Multiplex, mostrando os perfis das amostras obtidos após as reações. As amostras estão representadas pelos números de 1 a 11 e o padrão de peso molecular está Também está indicado. É possível observar, no gel, que as amostras 1,4,6,10,11 possuem amplificação de dois amplicons (2 bandas), enquanto as amostras 2 e 3 possuem amplificação de apenas uma ou nenhuma banda.

Figura 4: Gel de agarose, representativo dos perfis obtidos nas reações de PCR Multiplex, para avaliação e seleção das amostras selecionadas. As amostras estão indicadas pelos números de 1-11 e padrão de peso molecular (100pb) - PM. A seta indica a altura esperada para a migração das duas bandas

Após a PCR multiplex, as amostras que não apresentaram perfil adequado foram tratadas com a enzima UDG (Uracil-DNA-glicosilase) da Thermo Fisher (1 unidade/50ng e incubação de 15 min a 37°C), para diminuir o número de variantes artefatuais no sequenciamento. Essa enzima atua biologicamente como reparadora nos processos de desaminação, impedindo que C (citossina) se torne U (Uracila) e ocorram pareamentos incorretos na molécula de DNA, nas reações também atua como reparadora do material genético removendo grande parte dos contaminantes e agentes que podem degradar o DNA. Assim, em nossas reações, a enzima UDG age eliminando artefatos do DNA gerados por modificações químicas durante o processo de inclusão dos tecidos em parafina. Os resultados das razões qualitativas das bibliotecas estão expressos na Tabela 7. Após o tratamento com a enzima UDG para correção do material degradado, o perfil de grande parte das

amostras tornou-se adequado, o que nos possibilitou dar continuidade as reações de sequenciamento.

Tabela 7 - Perfil qualitativo das amostras e bibliotecas após tratamento com a enzima UDG para reduzir o índice de transições por transversões (TS/TV)

Amostra	Tratamento UDG	Status	N transições	N transversões	Ts/Tv
SEE1	Não tratada	excluída	7179	362	19,8
SEE 3	Tratada		1091	368	3,0
SEE 4	Tratada		787	363	2,2
SEE 5	Tratada		909	401	2,3
SEE 7	Tratada		953	434	2,2
CCS 2	Tratada		806	401	2,0
CCS 5	Tratada		878	379	2,3
CCS 9	Tratada		1422	442	3,2
CCS 13	Tratada		779	355	2,2
CCS 19	Não tratada		1127	371	3,0
LMS 38	Não tratada	excluída	2891	421	6,9
LMS 38	Tratada		504	169	3,0
LMS 39	Não tratada		1328	347	3,8
LMS 40b	Tratada		838	374	2,2
LMS 45	Tratada		1536	367	4,2
LMS 49	Não tratada	excluída	26071	466	55,9
LMS 45	Não tratada	excluída	24759	621	39,9
ADS 1	Tratada	excluída	3825	664	5,8
ADS 2-r	Tratada		2673	753	3,5

O que se avalia nas amostras é a razão TS/TV, ou seja, o número de cada classe de variante (transição ou tranversão) de artefatos nas amostras do sequenciamento. Na Tabela 7 pode se observar que o índice TS/TV é maior nas amostras marcadas em rosa (SEE1, LMS 38, LMS 49, LMS 55 e ADS 1), originando falsas chamadas de variantes. Após o tratamento fomos capazes de recuperar três dessas amostras (LMS 38, LMS 45 e ADS2-r - repetida) que obtiveram resultados adequados para participar do estudo. Dentre todas as amostras tratadas, apenas 2 amostras (CCS 19 e LMS 39) não tratadas entraram no estudo, isso se deve a qualidade do DNA das mesmas, apropriadas para a condução do experimento mesmo sem o tratamento. Após o sequenciamento da biblioteca, cinco amostras foram excluídas (LMS49, LMS45, LMS38, SEE1 e ADS1), pois não obtiveram valor adequado das razões de transição e transversão. As amostras LMS38 e LMS45 foram recuperadas, utilizando a tecnologia disponível para recuperação com a enzima UDG. Na Tabela 8 estão apresentados os resultados do sequenciamento das 14 amostras que permaneceram no estudo. A média da homogeneidade foi de 79% e a cobertura média das bases foi de 1470 vezes por base. A média da cobertura das amostras foi de 86% em 100x.

Os resultados obtidos das corridas de sequenciamento foram analisados utilizando o software *TorrentSuite* (Life Technologies). A partir desses dados foi possível identificar as alterações pontuais de substituição de bases e com possíveis impactos na função da proteína codificada pelo gene alterado (mutações *missense*, *nonsense*, *splice site*, perda de códon de terminação) e também pequenas inserções e deleções (*indels*).

Tabela 8 - Dados do Sequenciamento de Nova Geração. Resultados dos *reads*, dos índices de homogeneidade das amostras e qualidade da taxa de cobertura em 1x, 20x, 100x e 500x

Amostra	Leituras mapeadas	Homogeneidade (%)	Cobertura média por base	Cobertura (%)			
				1x	20x	100x	500x
SEE 3	34.871.087	63.18	1997	97.84	88.27	75.65	52.61
SEE 4	11.721.024	84.95	711	99.15	94.87	84.28	46.38
SEE 5	14.206.515	80.72	790	99.02	93.78	81.28	41.74
SEE 7	29.035.314	87.85	1772	99.46	97.32	93.45	75.97
CCS 2	43.411.049	89.53	2679	99.77	98.48	95.77	85.88
CCS 5	23.889.701	89.74	1474	99.62	97.64	93.29	76.43
CCS 9	33.958.927	70.01	1744	98.72	93.20	82.75	52.56
CCS 13	16.013.490	85.12	951	99.26	95.36	87.40	55.68
CCS 19*	21.554.257	90.51	1285	99.73	98.20	94.18	70.03
LMS 38	16.745.931	78.19	952	98.84	93.33	82.38	45.91
LMS 39*	22.247.077	81.44	1257	99.51	96.68	89.31	55.50
LMS 40b	42.707.599	79.40	2521	99.67	98.03	94.75	79.60
LMS 45	31.877.938	73.28	1535	99.64	96.96	88.51	49.57
ADS 2	25.426.871	52.59	921	87.79	80.75	64.34	37.81

*Amostras não tratadas com a enzima UDG

Após a aplicação dos filtros necessários para aumentar a fidelidade dos resultados, identificamos uma média de 39 inserções e 52 deleções por amostra. Foram detectadas 27 mutações *LoF* (*Loss of Function*/Proteína Truncada) e 43 mutações *missenses* (mutações aonde um aminoácido diferente é codificado), totalizando em 70 mutações filtradas, e, dentre estas, 25 se encontram no banco de dados do COSMIC (Catalogo de mutações somáticas) (tabela 9).

Depois do sequenciamento e da chamada de variantes, os arquivos VCFs com as variantes identificadas foram analisados no software VarSeq para aplicação dos filtros e priorização das variantes de interesse. O primeiro filtro foi aplicado focando na qualidade e frequências das alterações, com o objetivo de selecionar as variantes realmente somáticas e o segundo filtro focando na função e efeito da variante na proteína, com o objetivo de selecionar aquelas variantes que seriam mais relevantes em alterar as funções do gene.

A Tabela 10 apresenta a distribuição das mutações mais comuns encontradas nas amostras, por subtipo histológico. A coluna da esquerda indica a distribuição dos genes mutados, a do meio o número de mutações por subtipo histológico e a coluna da direita indica a quantidade e quais os subtipos histológicos que envolvem as mutações. As mutações mais comuns encontradas foram nos genes *TP53*, *KMT2D*, *ATM*, *DICER1*, *PIK3CA*, *TRRAP*.

Tabela 9 - Total de variantes resultantes da aplicação de filtros para aumentar a especificidade dos resultados do SNG (maior estringência)

Amostras	Geral				Variantes selecionadas		
	Total	SNV	Inserções	Deleções	LOFs	Missense	Cosmic
SEE 3	1551	1473	31	47	3	4	2
SEE 4	1249	1162	36	51	1	1	1
SEE 5	1416	1324	36	56	0	2	1
SEE 7	1494	1397	40	57	2	2	1
CCS 2	1332	1223	47	62	2	4	4
CCS 5	1362	1271	42	49	5	5	4
CCS 9	1972	1884	42	46	0	3	3
CCS 13	1234	1150	36	48	1	4	3
CCS 19	1604	1516	33	55	2	6	2
LMS 38	746	678	43	25	1	0	0
LMS 39	1768	1688	34	46	0	3	1
LMS 40b	1296	1193	42	61	1	2	1
LMS 45	2004	1921	36	47	3	1	2
ADS 2	3521	3406	41	74	6	6	0

*SEE- sarcoma do estroma endometrial, CCS- cacinossarcoma, LMS- leiomiiossarcoma, ADS- adenossarcoma

*SNV-*Single Nucleotide Variant*, LoFs-*Loss of Function*, COSMIC-Catalogue of Somatic Mutations in Cancer

Tabela 10 - Número de mutações mais comuns nos genes encontrados por tipo histológico. Genes presentes em duas ou mais amostras de sarcomas uterinos e carcinossarcomas

Gene	N amostras	Tipo histológico
TP53	8	4 CCS, 3 LMS, 1 SEE
KMT2D	5	2 CCS, 1 LMS, 1 SEE, 1 ADS
ATM	4	1 CCS, 2 LMS, 1 SEE
DICER1	3	2 CCS, 1 SEE
PIK3CA	3	3 CCS
TRRAP	3	2 CCS, 1 ADS
ATRX	2	1 LMS, 1 SEE
CREBBP	2	1 SEE, 1 ADS
DAXX	2	1 SEE, 1 ADS
DNMT3A	2	1 CCS, 1 ADS
DST	2	1 CCS, 1 SEE
EPHA7	2	1 CCS, 1 ADS
ERBB4	2	2 CCS
FN1	2	1 CCS, 1 SEE
KAT6B	2	1 CCS, 1 ADS
KNL1	2	1 CCS, 1 ADS
MTOR	2	1 CCS, 1 SEE
NF1	2	1 CCS, 1 SEE
NIN	2	1 LMS, 1 SEE
PDE4DIP	2	2 SEE
PRKDC	2	1 CCS, 1 ADS
RNF213	2	1 LMS, 1 ADS
TSC2	2	1 LMS, 1 ADS

Na Tabela 11, observa-se os genes com alterações mais frequentes, o tipo de mutação e sua posição. Além disso, são indicadas as alterações nas proteínas. Na terceira coluna, estão indicadas as referências de aminoácidos e as alterações (Ref/Alt), o efeito combinado dessas alterações (Missense ou LoF), nomenclaturas do DNA(c.) e da proteína (p.). As informações de nomenclatura podem ser inseridas para pesquisas em bancos de dados.

Tabela 11 - Mutações mais comumente encontradas no estudo, posições cromossômicas, efeitos e nomenclatura

Amostra	Chr:Pos	Ref/Alt	Genes	Efeito Combinado	Nomenclatura DNA	Nomenclatura proteína
CCS2	3:178921549	T/C	PIK3CA	Missense	c.1031T>C	p.Val344Ala
CCS2	17:7577547	C/A	TP53	Missense	c.734G>T	p.Gly245Val
CCS5	3:178952085	A/G	PIK3CA	Missense	c.3140A>G	p.His1047Arg
CCS5	11:108114777	C/A	ATM	LoF	c.594C>A	p.Cys198Ter
CCS5	14:95572101	G/A	DICER1	LoF	c.3007C>T	p.Arg1003Ter
CCS5	7:98513427	C/T	TRRAP	Missense	c.2281C>T	p.Arg761Trp
CCS9	12:49444719	G/A	KMT2D	Missense	c.2747C>T	p.Pro916Leu
CCS9	17:7578442	T/C	TP53	Missense	000546.5:c.488A>G	p.Tyr163Cys
CCS13	3:178916854	G/A	PIK3CA	Missense	c.241G>A	p.Glu81Lys
CCS13	12:49418435	-/C	KMT2D	LoF	c.15978_15979insG	p.Met5327Aspfs
CCS13	14:95574253	C/T	DICER1	Missense	c.2614G>A	p.Ala872Thr
CCS13	17:7577534	C/A	TP53	Missense	c.747G>T	p.Arg249Ser
CCS13	7:98609947	G/A	TRRAP	Missense	c.11549G>A	p.Arg3850His
CCS19	17:7577580	T/C	TP53	Missense	c.701A>G	p.Tyr234Cys
LMS39	17:7577545	T/C	TP53	Missense	_c.736A>G	p.Met246Val
LMS45	11:108160506	T/G	ATM	Missense	c.4414T>G	p.Leu1472Val
LMS45	17:7578290	C/G	TP53	LoF	c.560-1G>C	
LMS45	12:49445068	G/A	KMT2D	LoF	c.2398C>T	p.Gln800Ter
LMS40	11:108139268	C/T	ATM	Missense	c.2770C>T	p.Arg924Trp
LMS40	17:7577120	C/T	TP53	Missense	c.818G>A	p.Arg273His
SEE3	12:49418435	-/C	KMT2D	LoF	c.15978_15979insG	p.Met5327Aspfs
SEE3	12:49418436	A/G	KMT2D	Missense	c.15977T>C	p.Leu5326Pro
SEE3	17:7578176	C/T	TP53	LoF	c.672+1G>A	
SEE4	11:108141990	T/-	ATM	LoF	c.2934delT	p.Leu979Cysfs
SEE7	14:95590677	G/T	DICER1	LoF	c.1232C>A	p.Ser411Ter
ADS2	7:98501128	G/T	TRRAP	LoF	c.1024G>T	p.Glu342Ter
ADS2	12:49445219	-/T	KMT2D	LoF	c.2247_2248insA	p.Pro750Thrfs

No diagrama de Venn (Figura 5) podemos observar as mutações compartilhadas e individuais (específicas) de cada subtipo histológico de tumor avaliado. As amostras de LMS compartilham alterações de genes com CCS (*NF1*), SEE (*NIN* e *ATRX*) e com ADS (*TSC2* e *RNF213*), porém não apresentaram nenhuma mutação específica. As amostras de SEE's compartilham alterações com CCS (*DST*, *NF1*, *MTOR* e *DICER1*), ADS (*CREBBP* e *DAXX*) e apresentam um gene com alteração específica (*PDE4DIP*).

As amostras de CCS compartilham alterações de genes com ADS (*DNMT3A*, *EPHA7*, *KAT6B*, *KNL1*, *PRKDC* e *TRRAP*), SEE's (*DST*, *NF1*, *MTOR* e *DICER1*), LMS (*NF1*) e possuem 2 genes especificamente mutados (*ERBB4* e *PIK3CA*). As amostras de ADS compartilham genes alterados com SEE (*CREBBP* e *DAXX*), LMS (*RNF213* e *TSC2*) e não possuem nenhuma alteração específica. Entre as amostras de LMS, SEE e CCS, foram encontrados 2 genes compartilhados (*ATM* e *TP53*) e entre todas as amostras encontramos apenas 1 gene compartilhado (*KMT2D*).

Na Figura 6, pode-se observar a porcentagem de distribuição das mutações nas amostras incluídas no estudo de acordo com os genes identificados e tipo histológico de tumor no qual foram identificadas. Como pode ser visualizado, o gene com maior frequência de mutações, foi o *TP53*, com maior frequência nos LMS e CSS e em grande parte com mutação do tipo missense. A distribuição das mutações nas amostras e seus efeitos biológicos foram avaliadas quanto a sua compatibilidade com o banco de dados do *cBioPortal for CancerGenomics*. (<http://www.cbioportal.org/>).

Figura 5 - Diagrama de Venn (Oliveros J.C, 2015) construído utilizando os dados do sequenciamento gênico das amostras. Os números representam as mutações compartilhadas e individuais para cada subtipo histológico avaliado. Os nomes dos genes estão indicados

Figura 6 - Distribuição das mutações nas amostras e efeitos biológicos compatíveis com o banco de dados do *cBioPortal for CancerGenomics*. (<http://www.cbioportal.org/>). Cada retângulo cinza representa uma amostra conforme sequência indicada no canto inferior à direita. Estão apresentados os genes com maior frequência de alterações. As legendas para cada tipo de alteração (proteína truncada – quadrado preto ou mutação missense – quadrado verde) estão indicadas

Apesar de nossos esforços para realizar todas as técnicas propostas pelo grupo, não pudemos realizar as análises estatísticas comparativas dos pacientes com os genes encontrados no sequenciamento de nova geração, pois nosso número de amostras não foi suficiente para comparação.

De modo geral, foram encontradas alterações em genes que são compartilhados entre diferentes subtipos histológicos, genes mutados em apenas 1 subtipo histológico e um gene encontrado em todos os subtipos histológicos. Pudemos observar uma distribuição majoritária de mutações missense em nossas amostras, o que corrobora com a literatura dos sarcomas e dos carcinosarcomas.

5. DISCUSSÃO

Este trabalho representa uma primeira tentativa de realizar um *screening* para estabelecer um perfil mutacional para todos os subtipos de sarcomas uterinos e também para os carcinossarcomas. Em outros trabalhos foram realizadas análises de genéticas apenas um ou dois subtipos histológicos, com metodologias diferentes da utilizada aqui (MÄKINEN N, *et al.* 2016; LI J, *et al.* 2017). Das 66 amostras iniciais do estudo, apenas 14 apresentavam perfis adequados (menor degradação do material genético) para a realização do sequenciamento de nova geração.

Em nosso estudo, para as 14 amostras sequenciadas, as mutações mais comumente encontradas foram nos genes *TP53*, *KMT2D* e *ATM*. Outros estudos já reportaram alterações em alguns desses genes em sarcomas e tumores localizados em outros órgãos (Mäkinen N, *et al.* 2016; LV S, *et al.* 2017; Lee PJ, *et al.* 2017).

O *TP53* é um dos genes mais comumente mutados em câncer, com mutações presentes em sarcomas, carcinossarcomas e outros tumores. Esse gene é responsável por diversas atividades celulares, como: reparo de DNA, apoptose e alterações metabólicas. Atua nas células como gene supressor de tumor, prevenindo as alterações genéticas que podem iniciar o processo de tumorigênese. Nesse estudo o *TP53* foi o gene mais mutado, com alterações presentes em 50% das amostras, no entanto, apenas duas amostras apresentaram mutações LoF (c.672+1G>A e c.560-1G>C), resultando na perda de função da proteína. Mutações missense também podem levar a perda da

proteína, dependendo do tipo da troca de aminoácidos realizada. A maioria das mutações em *TP53* no nosso estudo foram missense.

O *TP53* possui uma característica única, que é o seu modo de inativação, quando comparado a outros tipos de supressores tumorais. Mais de 80% das mutações somáticas e germinativas em *TP53* são missense, que levam a produção de uma proteína mutada, totalmente estável que se acumula no núcleo das células tumorais (Bonora M, *et al.* 2015).

A variante c.560-1G>C encontra-se no banco de dados do *COSMIC*, e é encontrada em diversos tipos de tumores, entre eles: câncer de mama, ovário, pulmão, fígado e intestinos. Sabemos que a p53 está envolvida em diversos processos celulares, e essa variação compromete diversas vias, como: reposta no reparo do DNA, ciclo celular, apoptose e sinalização de outras moléculas. Apesar de estar descrita, poucas informações estão disponíveis sobre essa alteração.

A variação c.672+1G>A já é conhecida e foi descrita anteriormente como uma mutação importante na Síndrome de Li-Fraumeni. A Síndrome é associada com o desenvolvimento de diversos tipos de tumores, entre eles: sarcomas de partes moles, osteossarcoma, tumores de mamas, tumores cerebrais, carcinoma adrenocortical e leucemias (Kohlmann W & Gruber SB, 2014).

O gene *KMT2D*, outro gene encontrado com mutações em nossa casuística, é responsável por várias atividades moleculares, entre elas: diferenciação celular, desenvolvimento embrionário, metabolismo celular, transição celular e supressão de tumores. Esse gene participa ativamente de funções regulatórias epigenéticas, atua no remodelamento da cromatina e

possui enorme importância na regulação das histonas. O *KMT2D* codifica a enzima *lysine-specific methyltransferase 2D* que atua diretamente na modificação das histonas, no processo de metilação, controlando diversos genes e vias.

KMT2D é um importante supressor tumoral e defeitos em sua produção ou maquinaria podem levar a desregulação epigenética, culminando no aparecimentos de tumores. Ou seja, mutações de perda de função (*LoF*) são de importante impacto nesse gene. Mutações em *KMT2D* são descritas em diversos tipos de câncer, como: pulmões, cérebro, endométrio, leucemias e linfonodos. (Sobreira N, *et al.* 2017; Sakata S, *et al.* 2017). Em nosso estudo encontramos três variações *LoF* desse gene, a saber: c.15978_15979insG(2), c.2398C>T e c2247_2248insA. Nenhuma dessas alterações está descrita no banco de dados do COSMIC, não sendo possível confirmar sua interação com tumores específicos e doenças associadas.

O gene *ATM* é conhecido por participar do desenvolvimento de células do sistema nervoso central e do sistema imune. Também atua na detecção de danos no DNA, sendo reconhecido como um importante supressor tumoral. O *ATM* codifica uma proteína intranuclear que controla o quanto a célula cresce e se divide. Essa proteína, além de auxiliar a célula a reconhecer danos no DNA, coordena o reparo por outras proteínas, inclusive *p53*. A perda de função do gene pode levar a processos irreparáveis no controle de crescimento e divisão das células. O reparo eficiente pode ajudar a manter a estabilidade das células e das informações genéticas. (Lee PJ, *et al.* 2017; Han M, *et al.* 2017). Em nosso estudo, identificamos duas variações *LoF* no *ATM*: c.594C>A e c.2934delT. Nenhuma dessas alterações encontra-se depositada em bancos

de dados de tumores e alterações genéticas, assim, também não foi possível a confirmação de sua interação com tumores específicos, vias ou doenças associadas.

O painel utilizado neste trabalho possui 409 genes, dentre estes, buscamos, inicialmente, aqueles que compartilhavam mutações entre os diferentes subtipos histológicos de sarcomas uterinos. Apesar da heterogeneidade destes tumores, conseguimos identificar um gene em comum entre todos os subtipos (*KMT2D*). Como já foi mencionado anteriormente, o *KMT2D* é responsável por diversas funções celulares. Assim, nossos resultados podem ser indicativos de que os sarcomas uterinos e os carcinossarcomas possuem um microambiente tumoral comum, compartilhando uma mutação muito importante, que pode ser de grande utilidade para compreensão desses tumores.

Entre os CCS e os SEES identificamos alterações em genes já descritos na literatura para outros tumores, como: *DICER1*, *DST*, *NF1* e *MTOR*. O papel destes genes é bem compreendido, porém não sabemos ainda qual sua função na tumorigênese dos sarcomas e carcinossarcomas uterinos. Sabemos que a *DICER1* é muito importante e responsável pela regulação de diversos microRNA's. O gene *DICER1* é muito conservado entre as espécies, o que indica que mutações podem comprometer seu funcionamento e determinar o surgimento de tumores. O *MTOR* também possui um papel muito importante na biologia molecular das células, sendo responsável por participar da regulação da proliferação, motilidade e sobrevivência celular, síntese proteica e autofagia. É de amplo conhecimento o papel das mutações em *MTOR* nos tumores, e da importância na regulação de outros genes, já que sua via pode ser desregulada

por alterações genéticas em outras moléculas. (Ueda R, *et al.* 2009; Giguère V. 2018).

Com a heterogeneidade genética dos sarcomas uterinos e dos carcinossarcomas, não é difícil encontrarmos mutações em genes que são regulados ou fazem interações com outras vias, que é o caso do *MTOR*. Resultados anteriores de nosso grupo (Anjos, 2016), mostraram a regulação de microRNA's relacionados a diversas vias, inclusive *MTOR* e *DICER1*.

Os CCS e os ADS também compartilharam alterações em diversos genes, como: *EPHA7*, *PRKDC*, *KAT6B*, *DNMT3A*, *TRRAP* e *KNL1*. As mutações nesses genes estão diretamente relacionadas com a progressão tumoral, migração, ativação, interação célula-célula, invasão, metilação e desenvolvimento de síndromes como por exemplo Say-Barber-Biesecker-Young-Simpson pela mutação do gene *KAT6B*. Apesar disso, o papel dessas alterações nos sarcomas uterinos e carcinossarcomas, continua incerto, sendo necessário futuras investigações (Kim YR, *et al.* 2017).

Nosso objetivo inicial era identificar genes específicos para cada subtipo tumoral. Estabelecer uma assinatura para cada tumor, e, apesar da sua heterogeneidade fomos capazes de identificar três genes específicos para dois dos subtipos histológicos avaliados. Nos SEEs encontramos duas variantes no gene *PDE4DIP* (c.214C>T e c.6019G>T). A primeira variante é descrita no banco de dados COSMIC e foi encontrada primeiramente em carcinoma papilar de tireoide. Mutações nesse gene estão descritas em diversos tumores, como: câncer de mama, câncer de endométrio, colo de útero, ovários e trato urinário. A proteína codificada pelo gene *PDE4DIP* é responsável por anexar a fosfodiesterase 4D no complexo de Golgi. Defeitos neste gene podem causar

um distúrbio mieloproliferativo associado com eosinofilia. Apesar das informações disponíveis em bancos de dados e na literatura, não se sabe ainda seu papel na biologia dos tumores em geral. (Er TK, *et al.* 2016).

Nos CCS encontramos dois genes mutados, *PIK3CA* e *ERBB4*. Para o *PIK3CA* encontramos três variantes: c.1031T>C, c.3140A>G e c.241G>A. A variante NM_006218.3:c.1031T>C está descrita no banco de dados OncoKB como oncogênica e está relacionada diretamente com diversos tipos de câncer, incluindo câncer de mama, endometrial e cervical. As outras variantes não foram encontradas no banco de dados OncoKB. Lopez e colaboradores (2014), mostraram que a inibição do *PIK3CA* mutado, com Taselisib (inibidor seletivo do *PIK3CA*) reduziu a proliferação celular *in vitro* em carcinoma seroso uterino. Isso indica que o *PIK3CA* além de ser um gene importante na regulação do crescimento celular, pode atuar como um alvo terapêutico para controle de tumores serosos de útero e outros subtipos histológicos (Lopez S, *et al.* 2014; Cherniack AD, *et al.* 2017). Observou-se em um recente estudo do TCGA (*The Cancer Genome Atlas Network*) utilizando 57 amostras CCS, que metade dos tumores apresentou mutações em genes relacionados a via do PI3K, entre eles *PIK3CA*, *PTEN* e *PIK3R1*. Esses dados mostram que as mutações de *PIK3CA* estão presentes nos CCS, assim como no nosso estudo, e tem um grande potencial como alvo terapêutico.

Todas as variantes do *PIK3CA* encontradas nesse estudo são potencialmente patogênicas pelo banco de dados do ClinVar que reúne alterações germinativas e estão relacionadas com neoplasias uterinas. Apesar de nosso estudo estar focado em alterações somáticas, vale ressaltar que essas variantes estão relacionadas a outros tipos de tumor, como câncer

colorretal, câncer renal, glioblastomas, câncer de pulmão, câncer de colo de útero, câncer de mama, câncer de ovários, câncer de próstata e carcinossarcoma uterino. O *PIK3CA* é responsável pela manutenção da sobrevivência celular e da apoptose, como já mencionado anteriormente. Alterações no *PIK3CA* são comumente encontradas em tumores e a desregulação dos componentes de sua via estão associados com a carcinogênese. Nos tumores endometriais o *PIK3CA* é a segunda mutação mais frequente, atrás apenas do *PTEN*. As mutações no *PIK3CA* tendem a promover o crescimento celular das células, facilitando a sobrevivência dos tumores (Cherniack AD, *et al.* 2017; Chappell WH, *et al.* 2011). Porém, até o momento, não se sabe ao certo o papel deste gene nos sarcomas uterinos e nos carcinossarcomas.

No *ERBB4* encontramos duas variantes (c.782A>C ec.2513G>A). A segunda variante é descrita no banco de dados COSMIC. É uma variante potencialmente patogênica e está relacionada com cânceres de mama, fígado, pulmões, esfôfago, ovário, próstata, pele, estômago tecidos moles e trato urinário. O gene *ERBB4* é responsável por codificar uma proteína que está presente nos tecidos epiteliais dos mamíferos. É ativado pelos fatores de crescimento e tem um papel importante na proliferação, diferenciação e apoptose da célula. Mutações no *ERBB4* podem levar a uma característica tumoral conferindo à célula alta capacidade de proliferação e diferenciação. Existem muitos estudos sobre essa molécula em diversos tipos de tumor, porém pouco se sabe sobre seu papel na tumorigênese dos sarcomas uterinos e nos carcinossarcomas. (Davies S. *et al.* 2014).

Apesar de trabalharmos com amostras raras, tumores com baixa incidência e dificuldade para coleta de amostras, pudemos identificar diversas mutações que podem contribuir para um melhor entendimento da biologia dos sarcomas uterinos. Esses tumores, juntamente com os carcinosarcomas, possuem poucas definições quanto ao seu desenvolvimento, crescimento, diagnóstico e tratamento. Até hoje não existe diagnóstico pré-operatório preciso para esses tipos tumorais e apesar de raros, os sarcomas e os carcinosarcomas, são muito agressivos e seu prognóstico é muito ruim. Desse modo, é de suma importância a realização de trabalhos que tragam respostas e possíveis alternativas para o diagnóstico e tratamento desses tumores, bem como auxiliem a melhorar o seu prognóstico. Nosso estudo foi o primeiro, apesar do alto custo da técnica utilizada, a reunir todos os subtipos histológicos de sarcomas uterinos e carcinosarcomas. E, embora, tenha havido uma diminuição no número desejado de amostras a serem avaliadas, devido à qualidade do DNA obtido, os resultados foram muito satisfatórios e deram origem a uma nova linha de pesquisa em nosso grupo.

6. CONCLUSÕES

- Foram encontradas 128 variantes gênicas nos sarcomas uterinos e carcinossarcomas. A maioria delas caracterizadas como patogênicas e de relevância para a biologia molecular dos tumores. Dentre elas, 50 variantes foram caracterizadas como *LoF* e 78 *missense*.
- Dentre os 409 genes avaliados para mutações, os mais comuns foram: *TP53*, *KMT2D*, *ATM*, *DICER1*, *PIK3CA*, *TRRAP* e *ATRX*. Considerando mutações comuns entre os diferentes tipos tumorais avaliados, o gene *KMT2D* pode ser um indicador de semelhanças na origem dessas neoplasias. Como genes de assinatura específica, nos SEEs, para o gene *PDE4DIP*, e nos CCSs, para os genes *PIK3CA* e *ERBB4*, foram encontradas duas variantes exclusivas.
- Não foi possível avaliar a correlação entre os dados moleculares e os dados clínicos dos pacientes devido ao reduzido número de amostras para cada subtipo histológico que não foi adequado para realização de nenhum dos testes estatístico utilizados.

7. ANEXO

APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 25/11/2015, APROVOU o Protocolo de Pesquisa nº 477/15 intitulado: “ANÁLISE DO PERFIL GENÉTICO EM SARCOMAS UTERINOS E CARCINOSSARCOMAS.” apresentado pelo Departamento de OBSTETRÍCIA E GINECOLOGIA

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 466/12, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: Katia Cândido Carvalho

Pesquisador (a) Executante: Leonardo Tomiatti da Costa

CEP-FMUSP, 25 de Novembro de 2015.

Profa. Dra. Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, T. G. D. et al. Clinical and molecular features of uterine sarcomas. **Medical Express**, v. 1, n. 6, p. 291-297, 2014. ISSN 2358-0429.

AMANT, F. et al. Clinical management of uterine sarcomas. **The Lancet Oncology**, v. 10, n. 12, p. 1188-1198, 2009. ISSN 1470-2045.

ANJOS, L. G. . Estudo da expressão de microRNAs em amostras de carcinossarcomas e sarcomas uterinos / Laura Gonzalez dos Anjos. -- São Paulo, 2016.

BASHIR, S. et al. Molecular alterations of PIK3CA in uterine carcinosarcoma, clear cell, and serous tumors. **International Journal of Gynecological Cancer**, v. 24, n. 7, p. 1262-1267, 2014. ISSN 1048-891X.

BLOM, R.; GUERRIERI, C. Adenosarcoma of the uterus: a clinicopathologic DNA flow cytometric, p53 and mdm-2 analysis of 11 cases. **International Journal of Gynecological Cancer**, v. 9, p. 37-43, 1999. ISSN 1048-891X.

BONORA M, et al.. Molecular mechanisms of cell death: central implication of ATP synthase in mitochondrial permeability transition. **Oncogene**. 2015 Mar 19;34(12):1608. doi:10.1038/onc.2014.462.

BUERMANS, J.T. den DUNNEN, Next generation sequencing technology: Advances and applications, In Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - **Molecular Basis of Disease**, Volume 1842, Issue 10, 2014.

CANTRELL, L. A.; BLANK, S. V.; DUSKA, L. R. Uterine carcinosarcoma: a review of the literature. **Gynecologic Oncology**, v. 137, n. 3, p. 581-588, 2015. ISSN 0090-8258.

CHAPPELL W. H, et al. Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR inhibitors: rationale and importance to inhibiting these pathways in human health. **Oncotarget**. 2011

CHERNIACK AD et al. Integrated Molecular Characterization of Uterine Carcinosarcoma. **Cancer Cell**, 2017.

CHOI, Y. J. et al. Genomic landscape of endometrial stromal sarcoma of uterus. **Oncotarget**, v. 6, n. 32, p. 33319-33328, 2015.

CLEMENT P & SCULLY R. Mullerianadenosarcoma of the uterus: a clinicopathologic analysis of ten cases of a distinctive type of Mullerian mixed tumor. **Cancer** 1974; 34: 1138–1149.

CUPPENS, T.; TUYAERTS, S.; AMANT, F. Potential therapeutic targets in uterine sarcomas. **Sarcoma**, v. 2015, 2015. ISSN 1357-714X.

D'ANGELO, E.; PRAT, J. Uterine sarcomas: a review. **Gynecologic oncology**, v. 116, n. 1, p. 131-139, 2010. ISSN 0090-8258.

DAVIES S. et al. Highincidence of ErbB3, ErbB4, and MET expression in ovarian cancer. **International Journal of Gynecology Pathology**. 2014.

DENSCHLAG, D.et al. Sarcoma of the Uterus. Guideline of the DGOG (S2k-Level, AWMF Registry No. 015/074, August 2015). **GeburtshilfeFrauenheilkd**, v. 75, n. 10, p. 1028-1042, Oct 2015. ISSN 0016-5751 (Print) 0016-5751.

EIJKELENBOOM, A.et al. Reliable Next-Generation Sequencing of Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissue Using Single Molecule Tags. **Journal of Molecular Diagnostics**, v. 18, n. 6, p. 851-863, Nov 2016. ISSN 1525-1578.

EI MUSTAPHA BAHASSI, PETER J. STAMBROOK; Next-generation sequencing technologies: breaking the sound barrier of human genetics, **Mutagenesis**, Volume 29, Issue 5, 1 September 2014.

ENDRULLAT, C. et al. Standardization and quality management in next-generation sequencing. **Applied & Translational Genomics**, v. 10, p. 2-9, Sep 2016. ISSN 2212-0661.

ER TK, ET AL. Targeted next-generation sequencing formolecular diagnosis of endometriosis-associated ovarian cancer. **Journal of Molecular Medicine (Berl)**.2016.

FELIX AS, Cook LS, Gaudet MM, et al. The etiology of uterine sarcomas: a pooled analysis of the epidemiology of endometrial cancer consortium. **British Journal of Cancer**. 2013;108(3):727-734. doi:10.1038/bjc.2013.2.

GARCIA-MARTINEZ, E.et al. Current management of uterine sarcomas. **Clinical & Translational Oncology**, v. 13, n. 5, p. 307-14, May 2011. ISSN 1699-048x.

GIGUÈRE V. Canonical signaling and nuclear activity of mTOR: a teamwork effortto regulate metabolism and cell growth. **FEBS Journal**. 2018.

GOCKLEY, A. A.; RAUH-HAIN, J. A.; DEL CARMEN, M. G. Uterine leiomyosarcoma: a review article. **International Journal of Gynecological Cancer**, v. 24, n. 9, p. 1538-1542, 2014. ISSN 1048-891X.

GRADA, A.; WEINBRECHT, K. Next-generation sequencing: methodology and application. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 133, n. 8, p. 1-4, 2013. ISSN 0022-202X.

GRAY PN, DUNLOP CLM, ELLIOTT AM. Not All Next Generation Sequencing Diagnostics are Created Equal: Understanding the Nuances of Solid Tumor Assay Design for Somatic Mutation Detection. Farah CS, ed. **Cancers**. 2015;7(3):1313-1332.

HAN M, MA L, QU Y, TANG Y. Decreased expression of the ATM gene linked to poor prognosis for gastric cancer of different nationalities in Xinjiang. **Pathology - Research & Practice**. 2017.

HAYASHI, T. et al. Molecular Pathology and Novel Clinical Therapy for Uterine Leiomyosarcoma. **Anticancer Research**, v. 36, n. 10, p. 4997-5007, 2016. ISSN 0250-7005.

HODGSON A, AMEMIYA Y, SETH A, DJORDJEVIC B, PARRA-HERRAN C. High-grade Müllerian Adenosarcoma: Genomic and Clinicopathologic Characterization of a Distinct Neoplasm With Prevalent TP53 Pathway Alterations and Aggressive Behavior. **The American Journal of Surgical Pathology**. 2017.

HORNG, H.-C. et al. Uterine sarcoma Part II—Uterine endometrial stromal sarcoma: The TAG systematic review. **Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 55, n. 4, p. 472-479, 2016. ISSN 1028-4559.

HUANG, G. S. et al. Serum CA125 predicts extrauterine disease and survival in uterine carcinosarcoma. **Gynecologic oncology**, v. 107, n. 3, p. 513-517, 2007. ISSN 0090-8258.

Ion Torrent Workflow. Disponível em genomics.cn/en/navigation/show_navigation?nid=2640. Acesso em Jan, 2017.

KANTHAN, R.; SENGER, J.-L. B.; DIUDEA, D. Malignant mixed Mullerian tumors of the uterus: histopathological evaluation of cell cycle and apoptotic regulatory proteins. **World Journal Of Surgical Oncology**, v. 8, n. 1, p. 1, 2010. ISSN 1477-7819.

KIM YR, et al. Identifying the KAT6B Mutation via Diagnostic Exome Sequencing to Diagnose Say-Barber-Biesecker-Young-Simpson Syndrome in Three Generations of a Family. **Ann Rehabil Med**. 2017.

KOBAYASHI, H. et al. The biology of uterine sarcomas: a review and update. **Molecular and Clinical Oncology**, v. 1, n. 4, p. 599-609, 2013. ISSN 2049-9450.

KOH, W. J. et al. Uterine Sarcoma, Version 1.2016: Featured Updates to the NCCN Guidelines. **Journal of the National Comprehensive Cancer Network**, v. 13, n. 11, p. 1321-31, Nov 2015. ISSN 1540-1405.

KOHLMANN W & GRUBER SB. Lynch Syndrome. 2004 Feb 5 [updated 2014 May 22]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Stephens K, Amemiya A, editors. **GeneReviews® [Internet]**. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2018.

LATTEYER, S. et al. Targeted next-generation sequencing for TP53, RAS, BRAF, ALK and NF1 mutations in anaplastic thyroid cancer. **Endocrine**, v. 54, n. 3, p. 733-741, Dec 2016. ISSN 1355-008x.

LEE PJ, et al. Spectrum of mutations in leiomyosarcomas identified by clinical targeted next-generation sequencing. **Experimental and Molecular Pathology**. 2017 Feb;102(1):156-161. doi: 10.1016/j.yexmp.2017.01.012.

LI J, et al. Whole-Genome DNA Methylation Profiling Identifies Epigenetic Signatures of Uterine Carcinosarcoma. **Neoplasia**. 2017 Feb;19(2):100111. doi:10.1016.

LI, Y.-T.; TENG, S.-W. Surgery for endometrial cancer. **Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 55, n. 1, p. 152, 2016. ISSN 1028-4559.

LIN, G. et al. Comparison of the diagnostic accuracy of contrast-enhanced MRI and diffusion-weighted MRI in the differentiation between uterine leiomyosarcoma/smooth muscle tumor with uncertain malignant potential and benign leiomyoma. **Journal of Magnetic Resonance Imaging**, v. 43, n. 2, p. 333-342, 2016. ISSN 1522-2586.

LOPEZ S et al. Taselisib, a selective inhibitor of PIK3CA, is highly effective on PIK3CA-mutated and HER2/neu amplified uterine serous carcinoma in vitro and in vivo. **Gynecologic Oncology**. 2014.

LV S, et al Histone methyltransferase KMT2D sustains prostate carcinogenesis and metastasis via epigenetically activating LIFR and KLF4. **Oncogene**. 2017 Dec 22. doi: 10.1038/s41388-017-0026-x.

MÄKINEN, N. et al.. Exome Sequencing of Uterine Leiomyosarcomas Identifies Frequent Mutations in TP53, ATRX, and MED12. **PLoS Genetics**. 2016 Feb 18;12(2): e1005850.

MANCARI, R. et al. Adjuvant chemotherapy in stage I–II uterine leiomyosarcoma: A multicentric retrospective study of 140 patients. **Gynecologic Oncology**, v. 133, n. 3, p. 531-536, 2014. ISSN 0090-8258.

MCCONECHY, M. K. et al. In-depth molecular profiling of the biphasic components of uterine carcinosarcomas. **The Journal of Pathology: Clinical Research**, v. 1, n. 3, p. 173-185, 2015. ISSN 2056-4538.

MICCI, F. et al. Cytogenetic and Molecular Profile of Endometrial Stromal Sarcoma. **Genes, Chromosomes and Cancer**, 2016. ISSN 1098-2264.

MUZZEY, D.; EVANS, E. A.; LIEBER, C. Understanding the Basics of NGS: From Mechanism to Variant Calling. **Current Genetic Medicine Reports**, v. 3, n. 4, p. 158-165, 2015. ISSN 2167-4876.

MÄKINEN, N. et al. Exome Sequencing of Uterine Leiomyosarcomas Identifies Frequent Mutations in TP53, ATRX, and MED12. **PLoS Genetics**, v. 12, n. 2, p. e1005850, 2016. ISSN 1553-7404.

NAM JH & PARK JY. Update on treatment of uterine sarcoma. **Current Opinion in Obstetrics and Gynecology** 2010; 22: 36–42.

NATHENSON, M. J. et al. Uterine Adenosarcoma: a Review. **Current Oncology Reports**, v. 18, n. 11, p. 68, 2016. ISSN 1523-3790.

NORRIS HJ & TAYLOR HB. Mesenchymal tumors of the uterus. I. A clinical and pathological study of 53 endometrial stromal tumors. **Cancer** 1966; 19: 755–766.

OLIVEROS, J.C. Venny. *An interactive tool for comparing lists with Venn's diagrams*. <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html> 2015.

ONG, M. et al. Validation and utilisation of high-coverage next-generation sequencing to deliver the pharmacological audit trail. **British Journal Of Cancer**, v. 111, n. 5, p. 828-836, 2014. ISSN 0007-0920.

PEROT, G. et al. MED12 alterations in both human benign and malignant uterine soft tissue tumors. **PLoS One**, v. 7, n. 6, p. e40015, 2012. ISSN 1932-6203.

PRAT, J. FIGO staging for uterine sarcomas. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, v. 104, n. 3, p. 177-178, 2009. ISSN 0020-7292.

PRUITT, K. Molecular and Cellular Changes During Cancer Progression Resulting From Genetic and Epigenetic Alterations. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**, v. 144, p. 3-47, 2016. ISSN 1877-1173.

REID, G. C. et al. The role of pelvic exenteration for sarcomatous malignancies. **Obstetrics & Gynecology**, v. 74, n. 1, p. 80-84, 1989. ISSN 0029-7844.

SAGAE S, YAMASHITA K, ISHIOKA S et al. Preoperative diagnosis and treatment results in 106 patients with uterine sarcoma in Hokkaido, Japan. **Oncology** 2004; 67: 33–39.

SAKATA S, et al. Individual Clinically Diagnosed with CHARGE Syndrome but with a Mutation in KMT2D, a Gene Associated with Kabuki Syndrome: A Case Report. **Frontiers in Genetics**. 2017.

SEAGLE BL, SOBECKI-RAUSCH J, STROHL AE, SHILPI A, GRACE A, SHAHABI S. Prognosis and treatment of uterine leiomyosarcoma: A National Cancer Database Study. **Gynecologic Oncology**. 2017.

SEDDON, B. M.; DAVDA, R. Uterine sarcomas—recent progress and future challenges. **European Journal Of Radiology**, v. 78, n. 1, p. 30-40, 2011. ISSN 0720-048X.

SOBREIRA N, et al. Patients with a Kabuki syndrome phenotype demonstrate DNAmethylation abnormalities. **European Journal Of Human Genetics**. 2017.

THOMAKOS, N. et al. Serum CA 125, CA 15-3, CEA, and CA 19-9: a prognostic factor for uterine carcinosarcomas? **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 287, n. 1, p. 97-102, 2013. ISSN 0932-0067.

TORO, J. R. et al. Incidence patterns of soft tissue sarcomas, regardless of primary site, in the surveillance, epidemiology and end results program, 1978–2001: an analysis of 26,758 cases. **International Journal of Cancer**, v. 119, n. 12, p. 2922-2930, 2006. ISSN 1097-0215.

TROPÉ, C. G.; ABELER, V. M.; KRISTENSEN, G. B. Diagnosis and treatment of sarcoma of the uterus. A review. **Acta Oncologica**, v. 51, n. 6, p. 694-705, 2012. ISSN 0284-186X.

UEDA R, et al. Dicer-regulated microRNAs 222 and 339 promote resistance of cancer cells to cytotoxic T-lymphocytes by down-regulation of ICAM-1. **Proceedings of National Academy Of Sciences of the United States of America**. 2009.

WEN, K.-C.et al. Uterine sarcoma Part I—Uterine leiomyosarcoma: The Topic Advisory Group systematic review. **Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 55, n. 4, p. 463-471, 2016. ISSN 1028-4559.

WORLD HEALTH. In TAVASSOLI FA & DEVILEE P (eds.). **Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs**. Lyon: IARC Press, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs**.Internat.Agency for Research on Cancer, 2014.

YADAV, N. K. et al. Next generation sequencing: potential and application in drug discovery. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 802437, 2014. ISSN 1537-744x.

YANG, C.-Y.et al. Targeted next-generation sequencing of cancer genes identified frequent TP53 and ATRX mutations in leiomyosarcoma. **American Journal of Translational Research**, v. 7, n. 10, p. 2072, 2015.

ZALOUDEK CJ & NORRIS HJ.Adenofibroma and adenosarcoma of the uterus: a clinicopathologic study of 35 cases. **Cancer** 1981.