

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de medicina
Programa de pós-graduação em medicina molecular

JOSIANE ALVES FRANÇA

**IDENTIFICAÇÃO DE *DRIVERS* MOLECULARES NO TUMOR DE
CÉLULAS GRANULARES ORAL**

Belo Horizonte
2020

Josiane Alves França

**IDENTIFICAÇÃO DE *DRIVERS* MOLECULARES NO TUMOR DE
CÉLULAS GRANULARES ORAL**

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-graduação em Medicina Molecular da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Medicina Molecular.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Carolina Cavaliéri Gomes

Coorientadores: Prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez e Prof.^a Dr.^a Sílvia Ferreira de Sousa

Belo Horizonte - MG
2020

F837i França, Josiane Alves.
Identificação de Drivers Moleculares no Tumor de Células Granulares Oral [manuscrito]. / Josiane Alves França. - - Belo Horizonte: 2020.
66f.: il.
Orientador (a): Carolina Cavaliéri Gomes.
Coorientador (a): Ricardo Santiago Gomez; Sílvia Ferreira de Sousa.
Área de concentração: Medicina Molecular.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

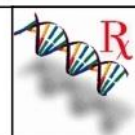
1. Tumor de Células Granulares. 2. Sequenciamento de Nucleotídeos em Larga Escala. 3. Sequenciamento Completo do Exoma. 4. Genética. 5. Lisossomos. 6. ATPases Vacuolares Próton-Translocadoras. 7. Dissertação Acadêmica. I. Gomes, Carolina Cavaliéri. II. Gomez, Ricardo Santiago. III. Sousa, Sílvia Ferreira de. IV. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. V. Título.

NLM: QZ 365



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA MOLECULAR



ATA DA DEFESA DE TESE DA ALUNA JOSIANE ALVES FRANÇA

Realizou-se, no dia 09 de julho de 2020, às 14:00 horas, meet.google.com/vkj-gttb-ugb, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de tese, intitulada *DENTIFICAÇÃO DE DRIVERS MOLECULARES NO TUMOR DE CÉLULAS GRANULARES ORAL*, apresentada por JOSIANE ALVES FRANÇA, número de registro 2016702707, graduada no curso de BIOMEDICINA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em MEDICINA MOLECULAR, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Carolina Cavalieri Gomes - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), Prof(a). Silvia Ferreira de Sousa (Universidade Federal de Minas Gerais), Prof(a). Rennan Garcias Moreira (UFMG), Prof(a). Elisa Carvalho de Siqueira (Faculdade Sete Lagoas), Prof(a). Fabrício Tinôco Alvim de Souza (Centro Universitário UNA), Prof(a). Luciana Bastos Rodrigues (UFMG).

A Comissão considerou a tese:

(!) Aprovada

() Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.
Belo Horizonte, 09 de julho de 2020.

Prof(a). Carolina Cavalieri Gomes (Doutora)

Prof(a). Silvia Ferreira de Sousa (Doutora)

Prof(a). Rennan Garcias Moreira (Doutor)

Prof(a). Elisa Carvalho de Siqueira (Doutora)

Prof(a). Fabrício Tinôco Alvim de Souza (Doutor)

Prof(a). Luciana Bastos Rodrigues (Doutor)

Digitally signed by LUIZ ARMANDO CUNHA DE MARCO 09902856187
DN: c=BR, o=ICP-Brasil, ou=SEM BRANCO, ou=16636540000104, ou=AC-PRODEMGE-RFB, ou=RFB e-CFP, A3, ou=Secretaria da Receita Federal do Brasil - RFB, cn=LUIZ ARMANDO CUNHA DE MARCO 09902856187
Date: 2020.07.13 08:00:46 -03'00'

Dedico este trabalho aos meus pais, Ilda e Arnaldo, e à minha irmã Luciana.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sempre me guiar.

Aos meus pais, pelo amor, dedicação e incentivo incondicionais.

À minha irmã pela cumplicidade e apoio.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Carolina Cavaliéri Gomes, pela dedicação, confiança, oportunidade, ensinamentos e paciência.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez, pelas reflexões e valiosas contribuições durante esse trabalho.

À minha coorientadora, Prof^a. Dr^a. Sílvia Ferreira de Sousa pela contribuição na parte experimental e amostral desse estudo.

À Professora Dr^a. Marina Diniz e ao pesquisador Tenzin Gayden, por compartilharem ensinamentos e contribuírem com esse trabalho.

Ao Professor Jean Nunes Santos da Universidade Federal da Bahia, por contribuir com amostras para o estudo.

À Dr^a. Nada Jabado, pela orientação durante o doutorado sanduíche, pela oportunidade e por permitir novos e significantes aprendizados.

A todos do laboratório Jabado, agradeço pela ótima receptividade, conhecimentos compartilhados, além da convivência cultural enriquecedora, em especial à Sima Khazaei, pela dedicação e paciência ao me ensinar e pelo companheirismo.

Aos Professores Fabrício Tinoco Alvim de Souza, Thais dos Santos Fontes Pereira e Vanessa de Fátima Bernardes, pela avaliação e tempo, assim como inestimáveis considerações no exame de Qualificação.

Aos laboratórios multiusuários do departamento de bioquímica e imunologia e de Genômica do ICB, pelo uso dos equipamentos e pelo auxílio na técnica de NGS, em especial ao Rennan Garcias Moreira.

À Letícia Martins Guimarães, por ter sido a segunda observadora nas contagens.

Aos colegas do laboratório de patologia molecular, pela boa convivência, apoio e contribuição durante este trabalho.

A equipe do Laboratório de Patologia Buco-Maxilo-Facial, Domênico, Daniela e Mara pelo auxílio.

Aos familiares e amigos, pelo carinho e incentivo constante.

Aos pacientes, que gentilmente colaboraram para a realização deste estudo.

Ao Professor e Coordenador do Programa em Medicina Molecular, Luiz Armando De Marco, pela disponibilidade e apoio.

Ao apoio financeiro do CNPQ que concedeu a bolsa de doutorado durante este trabalho, CAPES que forneceu a bolsa de doutorado sanduíche no exterior durante um ano e da FAPEMIG.

A todos que contribuíram para este trabalho, muito obrigada.

“O começo de todas as ciências é o espanto de as coisas serem o que são”.

Aristóteles.

RESUMO

O tumor de células granulares (TCG) é uma neoplasia benigna de tecidos moles de patogênese desconhecida que afeta principalmente a região da cabeça e pescoço. Os TCGs são derivados de células de Schwann e seus grânulos intracitoplasmáticos são considerados autofagossomos ou autofagolisossomos e são consistentes com o acúmulo de mielina. Neste estudo, uma amostra de conveniência de TCGs orais foi sequenciada por sequenciamento de nova geração com o objetivo de investigar a presença de variantes patogênicas. Em uma primeira etapa, investigamos a presença de mutações condutoras (do inglês *drivers*) no TCG oral esporádico por sequenciamento de nova geração alvo específico (do inglês *targeted Next-Generation Sequencing*) utilizando um painel de 50 oncogenes e genes supressores de tumor frequentemente mutados em neoplasias humanas. Mutações em *KDR*, *GNAQ* e *ATM* foram identificadas nestas lesões pela primeira vez, mas nenhuma mutação recorrente foi observada no coorte de 6 tumores estudados. Assim, em uma segunda etapa buscamos identificar mutações condutoras sem utilizar um painel de alvos pré-definidos, usando, portanto, a técnica de sequenciamento completo de exoma (do inglês *Whole-Exome Sequencing*, WES) para sequenciar um coorte de descoberta de 7 tumores. Os resultados do WES revelaram duas novas variantes nos genes do complexo V-ATPase: deleção *frameshift* c.746_749del em *ATP6AP1* resultando em p.P249Hfs*4, e SNV *nonsynonymous* c.G868A em *ATP6V1A* resultando em p.D290N. Essas variantes ocorreram em um único caso cada, e foram investigadas por sequenciamento de Sanger em mais 15 amostras, não sendo detectadas em nenhuma delas. As 5 amostras que na análise por WES foram wild-type para as variantes nos genes do complexo V-ATPase, apresentaram variantes nos genes que fazem parte das redes endossômicas/lisossômicas/autofagossômicas, incluindo *ABCA8*, *ABCC6*, *AGAP3*, *ATG9A*, *CTSB*, *DNAJC13*, *GALC*, *NPC1*, *SLC15A3*, *SLC31A2* e *TMEM104*. Embora os mecanismos envolvidos na iniciação e progressão do TCG oral permaneçam obscuros, nossos resultados sugerem que os TCGs orais têm variantes da V-ATPase semelhantes aos TCGs que ocorrem em outros órgãos/tecidos, além de mostrar variantes nos genes do lisossomo/endossomo/autofagossomo.

Palavras-chave: Tumor de células granulares oral. Sequenciamento de nova geração. Sequenciamento completo do exoma. Genética. Mutações. Lisossomos. V-ATPase.

ABSTRACT

Granular cell tumor (GCT) is a benign soft tissue neoplasm of unknown pathogenesis that mainly affects the head and neck region. GCTs are derived from Schwann cells and, ultrastructurally, their intracytoplasmic granules are considered autophagosomes or autophagolysosomes, and are consistent with myelin accumulation. In this study, a convenience sample of oral GCTs was sequenced by next generation sequencing in order to investigate the presence of pathogenic variants. In a first step, we investigated the presence of driver mutations in sporadic oral GCT by targeted next-generation sequencing using a panel of 50 oncogenes and tumor suppressor genes commonly altered in human neoplasms. Mutations in *KDR*, *GNAQ* and *ATM* were reported for the first time, but no recurrent mutations were observed in the discovery cohort of 6 tumors. In a second step, we seek to identify driver mutations without using a panel of predefined targets, therefore using the Whole-exome sequencing (WES) technique to sequence a discovery cohort of 7 tumors. WES results showed two new variants in genes of the V-ATPase complex: *ATP6AP1* frameshift deletion c.746_749del, leading to p.P249Hfs*4, and *ATP6V1A* nonsynonymous SNV c.G868A, leading to p.D290N. These variants occurred in one case each and were investigated by Sanger sequencing in 15 more samples, not being detected in any of them. With regard to the 5 samples that were wild-type for the variants in genes of V-ATPase complex, at least two samples presented variants in genes that are part of endosomal/lysosomal/autophagosomal networks including *ABCA8*, *ABCC6*, *AGAP3*, *ATG9A*, *CTSB*, *DNAJC13*, *GALC*, *NPC1*, *SLC15A3*, *SLC31A2* and *TMEM104*. Although the mechanisms involved in oral GCT initiation and progression remains unclear, our results suggest that oral GCTs have V-ATPase variants similarly to GCTs from other tissues/organs, and additionally show variants in lysosomes/endosomes/autophagosomal genes.

Keywords: Oral granular cell tumor. Next-generation sequencing. Whole-exome sequencing. Genetics. Mutations. Lysosomes. V-ATPase.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características clínicas e ensaios moleculares.....	36
Tabela 2 – Variantes de nucleotídeo único detectados com uma profundidade de leitura superior a 100 vezes em tumor de células granulares oral	38
Tabela 3 – Resultado das médias das contagens de imuno-histoquímica em cada caso pelos dois examinadores	41
Tabela 4 – Dados clínicos dos 22 TCGs orais e informações do sequenciamento das variantes detectadas do complexo V-ATPase.....	45
Tabela 5 – Variantes em genes do complexo V-ATPase e de genes relacionados aos lisossomos, endossomos e autofagossomos	47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Apresentação clínica e histopatológica do tumor de células granulares oral	24
Figura 2 – Representação esquemática da participação do lisossomo nas vias de digestão celular	25
Figura 3 – Desenho esquemático do complexo V-ATPase	27
Figura 4 – Fluxograma da metodologia do trabalho	29
Figura 5 – Capturas de tela do IGV ilustrando leituras de variantes de nucleotídeo único deletérias nos genes <i>SMO</i> , <i>KDR</i> e <i>ATM</i>	40
Figura 6 – Perfil de imunomarcacão dos TCGs orais	42
Figura 7 – Dados clínicos e moleculares dos TCGs orais	46
Figura 8 – Resposta do dano ao DNA mediada por <i>ATM</i>	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>ABCA8</i>	Do inglês <i>ATP binding cassette subfamily A member 8</i>
<i>ABCC10</i>	Do inglês <i>ATP binding cassette subfamily C member 10</i>
<i>ABCC2</i>	Do inglês <i>ATP binding cassette subfamily C member 2</i>
<i>ABCC6</i>	Do inglês <i>ATP binding cassette subfamily C member 6</i>
<i>ABCD4</i>	Do inglês <i>ATP binding cassette subfamily D member 4</i>
<i>ABL1</i>	Do inglês <i>Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>
<i>AGAP3</i>	Do inglês <i>ArfGAP with GTPase domain, ankyrin repeat and PH domain 3</i>
<i>AHCY</i>	Do inglês <i>adenosylhomocysteinase</i>
<i>AKT1</i>	Do inglês <i>v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1</i>
<i>ALK</i>	Do inglês <i>anaplastic lymphoma kinase</i>
<i>APC</i>	Do inglês <i>adenomatous polyposis coli</i>
<i>ARSA</i>	Do inglês <i>arylsulfatase A</i>
<i>AT6V0A4</i>	Do inglês <i>ATPase H⁺ transporting V0 subunit a4</i>
<i>ATG2A</i>	Do inglês <i>autophagy related 2A</i>
<i>ATG9A</i>	Do inglês <i>autophagy related 9A</i>
<i>ATG9B</i>	Do inglês <i>autophagy related 9B</i>
<i>ATM</i>	Do inglês <i>ATM serine/threonine kinase</i>
<i>ATP6AP1</i>	Do inglês <i>ATPase H⁺ transporting accessory protein 1</i>
<i>ATP6AP2</i>	Do inglês <i>ATPase H⁺ transporting accessory protein 2</i>
<i>ATP6V0A1</i>	Do inglês <i>ATPase H⁺ transporting V0 subunit a1</i>
<i>ATP6V0A2</i>	Do inglês <i>ATPase H⁺ transporting V0 subunit a2</i>
<i>ATP6V0B</i>	Do inglês <i>ATPase H⁺ transporting V0 subunit b</i>

<i>ATP6V0C</i>	Do inglês <i>ATPase H+ transporting V0 subunit c</i>
<i>ATP6V0D1</i>	Do inglês <i>ATPase H+ transporting V0 subunit d1</i>
<i>ATP6V0D2</i>	Do inglês <i>ATPase H+ transporting V0 subunit d2</i>
<i>ATP6V0E1</i>	Do inglês <i>ATPase H+ transporting V0 subunit e1</i>
<i>ATP6V0E2</i>	Do inglês <i>ATPase H+ transporting V0 subunit e2</i>
<i>ATP6V1A</i>	Do inglês <i>ATPase H+ transporting V1 subunit A</i>
<i>ATP6V1B1</i>	Do inglês <i>ATPase H+ transporting V1 subunit B1</i>
<i>ATP6V1B2</i>	Do inglês <i>ATPase H+ transporting V1 subunit B2</i>
<i>ATP6V1C1</i>	Do inglês <i>ATPase H+ transporting V1 subunit C1</i>
<i>ATP6V1C2</i>	Do inglês <i>ATPase H+ transporting V1 subunit C2</i>
<i>ATP6V1D</i>	Do inglês <i>ATPase H+ transporting V1 subunit D</i>
<i>ATP6V1F</i>	Do inglês <i>ATPase H+ transporting V1 subunit F</i>
<i>ATP6V1G1</i>	Do inglês <i>ATPase H+ transporting V1 subunit G1</i>
<i>ATP6V1G2</i>	Do inglês <i>ATPase H+ transporting V1 subunit G2</i>
<i>ATP6V1G3</i>	Do inglês <i>ATPase H+ transporting V1 subunit G3</i>
<i>ATP6V1H</i>	Do inglês <i>ATPase H+ transporting V1 subunit H</i>
bp	Do inglês <i>base pairs</i>
<i>BRAF</i>	Do inglês <i>v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B</i>
<i>C16orf62</i>	Do inglês <i>chromosome 16 open reading frame 62</i>
<i>CACFD1</i>	Do inglês <i>calcium channel flower domain containing 1</i>
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
<i>CDH1</i>	Do inglês <i>cadherin 1</i>
<i>CDKN2A</i>	Do inglês <i>cyclin dependent kinase inhibitor 2A</i>
cm	Centímetro

CNPQ	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
COSMIC	Do inglês <i>Catalogue of Somatic Mutations in Cancer</i>
CSAD	Do inglês <i>cysteine sulfinic acid decarboxylase</i>
CSF1R	Do inglês <i>colony stimulating factor 1 receptor</i>
CTNNB1	Do inglês <i>catenin beta 1</i>
CTSB	Do inglês <i>cathepsin B</i>
DAB	Diaminobenzidina
dbSNP	Do inglês <i>Single Nucleotide Polymorphism Database of genomic variants</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNAJC13	Do inglês <i>DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member C13</i>
EGFR	Do inglês <i>epidermal growth factor receptor</i>
EPRS	Do inglês <i>glutamyl-prolyl-tRNA synthetase 1</i>
ERBB2	Do inglês <i>v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2</i>
ERBB4	Do inglês <i>v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 4</i>
ExAC	Do inglês <i>Exome Aggregation Consortium</i>
EZH2	Do inglês <i>enhancer of zeste homolog 2 (Drosophila)</i>
F	Feminino
FBXW7	Do inglês <i>F-box and WD repeat domain containing 7</i>
FFPE	Do inglês <i>Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded</i>
FGFR1	Do inglês <i>fibroblast growth factor receptor 1</i>
FGFR2	Do inglês <i>fibroblast growth factor receptor 2</i>

<i>FGFR3</i>	Do inglês <i>fibroblast growth factor receptor 3</i>
<i>FLT3</i>	Do inglês <i>fms-related tyrosine kinase 3</i>
<i>GALC</i>	Do inglês <i>galactosylceramidase</i>
γ H2AX	Do inglês <i>Phospho-Histona H2AX Ser139</i>
GCT	Do inglês <i>Granular cell Tumor</i>
gDNA	DNA genômico
<i>GNA11</i>	Do inglês <i>G protein subunit alpha 11</i>
<i>GNAQ</i>	<i>Do inglês G protein subunit alpha q</i>
<i>GNAS</i>	Do inglês <i>GNAS complex locus</i>
gnomAD	Do inglês <i>The Genome Aggregation Database</i>
°C	Graus Celsius
<i>GSK3</i>	<i>Do inglês glycogen synthase kinase 3</i>
H&E	Hematoxilina e eosina
<i>HEXB</i>	Do inglês <i>hexosaminidase subunit beta</i>
Hg19	Do inglês <i>Human Genome version 19</i>
HGMD	Do inglês <i>The Human Gene Mutation Database</i>
<i>HNF1A</i>	Do inglês <i>hepatic nuclear factor 1</i>
<i>HRAS</i>	Do inglês <i>v-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
<i>IDH1</i>	Do inglês <i>isocitrate dehydrogenase (NADP (+)) 1</i>
<i>IDH2</i>	Do inglês <i>isocitrate dehydrogenase (NADP (+)) 2</i>
IGV	Do inglês <i>Integrated Genomics Viewer</i>
IHQ	Imuno-histoquímica
INDEL	Do inglês <i>insertion/deletion</i>
ISPs	Do inglês <i>ION Sphere Particles</i>

<i>JAK2</i>	Do inglês <i>Janus kinase 2</i>
<i>JAK3</i>	Do inglês <i>Janus kinase 3</i>
<i>KCTD12</i>	Do inglês <i>potassium channel tetramerization domain containing 12</i>
<i>KDR</i>	Do inglês <i>kinase insert domain receptor</i>
<i>KIT</i>	Do inglês <i>v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog</i>
<i>KRAS</i>	Do inglês <i>v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma 2 viral oncogene homolog</i>
<i>LAMP1</i>	Do inglês <i>lysosomal associated membrane protein 1</i>
<i>LAPTM4B</i>	Do inglês <i>lysosomal protein transmembrane 4 beta</i>
LOH	Do inglês Loss of heterozygosity
M	Masculino
MAF	Do inglês <i>Minor Allele Frequency</i>
<i>MET</i>	Do inglês <i>met proto-oncogene</i>
µl	Microlitro
µM	Micromolar
µm	Micrômetros
<i>MLH1</i>	Do inglês <i>mutL homolog 1</i>
MNV	Do inglês <i>multi-nucleotide variant</i>
<i>MPL</i>	Do inglês <i>myeloproliferative leukemia virus oncogene</i>
<i>NAGLU</i>	Do inglês <i>N-acetyl-alpha-glucosaminidase</i>
ND	Não Disponível
NF	Não Fornecido
ng	Nanogramas
NGS	Do inglês <i>Next-Generation Sequencing</i>

<i>NOTCH1</i>	Do inglês <i>notch receptor 1</i>
<i>NPC1</i>	Do inglês <i>NPC intracellular cholesterol transporter 1</i>
<i>NPM1</i>	Do inglês <i>nucleophosmin 1</i>
<i>NRAS</i>	Do inglês <i>neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
pChk2	Do inglês <i>Phospho-Chk2-Thr68</i>
PCR	Do inglês <i>polymerase chain reaction</i>
<i>PDGFRA</i>	Do inglês <i>platelet-derived growth factor receptor alfa</i>
PGM	Do inglês <i>Ion Personal Genome Machine</i>
pH	Potencial de Hidrogênio
<i>PIK3CA</i>	Do inglês <i>phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha</i>
pM	Picomolar
PolyPhen2	Do inglês <i>Polymorphism Phenotyping v2</i>
<i>PTEN</i>	Do inglês <i>phosphatase and tensin homolog</i>
<i>PTPN11</i>	Do inglês <i>protein tyrosine phosphatase non-receptor type 11</i>
Q score	Do inglês <i>Phred quality score</i>
QC	Do inglês <i>Quality Control</i>
qPCR	Do inglês <i>quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
<i>RB1</i>	Do inglês <i>RB transcriptional corepressor 1</i>
<i>RB1CC1</i>	Do inglês <i>RB1 inducible coiled-coil 1</i>
<i>RET</i>	Do inglês <i>ret proto-oncogene</i>
<i>SGSH</i>	Do inglês <i>N-sulfoglucosamine sulfohydrolase</i>
SIFT	Do inglês <i>Sorting Intolerant From Tolerant</i>

SLC11A2	Do inglês <i>solute carrier family 11 member 2</i>
SLC15A3	Do inglês <i>solute carrier family 15 member 3</i>
SLC17A5	Do inglês <i>solute carrier family 17 member 5</i>
SLC26A1	Do inglês <i>solute carrier family 26 member 1</i>
SLC26A11	Do inglês <i>solute carrier family 26 member 11</i>
SLC2A8	Do inglês <i>solute carrier family 2 member 8</i>
SLC31A2	Do inglês <i>solute carrier family 31 member 2</i>
SLC38A9	Do inglês <i>solute carrier family 38 member 9</i>
SLC46A3	Do inglês <i>solute carrier family 46 member 3</i>
SLC9A6	Do inglês <i>solute carrier family 9 member 6</i>
SLCO2A1	Do inglês <i>solute carrier organic anion transporter family member 2A1</i>
SLCO2B1	Do inglês <i>solute carrier organic anion transporter family member 2B1</i>
SMAD4	Do inglês <i>SMAD family member 4</i>
SMARCB1	Do inglês <i>SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily b, member 1</i>
SMO	Do inglês <i>smoothened, frizzled class receptor</i>
SMPD1	Do inglês <i>sphingomyelin phosphodiesterase 1</i>
SNP	Do inglês <i>common single nucleotide polymorphisms</i>
SNV	Do inglês <i>single nucleotide variant</i>
SRC	Do inglês <i>SRC proto-oncogene, non-receptor tyrosine kinase</i>
STK11	Do inglês <i>serine/threonine kinase 11</i>
TCG	Tumor de Células Granulares
TCIRG1	Do inglês <i>T cell immune regulator 1, ATPase H⁺ transporting V0 subunit a3</i>

<i>TMEM104</i>	Do inglês <i>transmembrane protein 104</i>
<i>TP53</i>	Do inglês <i>tumor protein p53</i>
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
<i>ULK1</i>	Do inglês <i>unc-51 like autophagy activating kinase 1</i>
VAF	Do inglês <i>Variant Allele Frequencies</i>
V-ATPase	Do inglês <i>Vacuolar Adenosinatrifosfatase</i>
<i>VHL</i>	Do inglês <i>von Hippel-Lindau tumor suppressor</i>
WES	Do inglês <i>Whole-Exome Sequencing</i>
<i>WIP1</i>	Do inglês <i>WD repeat domain, phosphoinositide interacting 1</i>
WT	Do inglês <i>Wild-Type</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO DA LITERATURA	22
2.1 Tumor de células granulares.....	22
2.2 Lisossomos e Complexo V-ATPase	25
3 OBJETIVOS.....	28
3.1 Objetivo geral	28
3.2 Objetivos específicos.....	28
4 MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1 Seleção amostral	30
4.2 Extração de DNA	30
4.3 Primeira Parte: Sequenciamento de nova geração alvo específico para painel de genes e imuno-histoquímica.....	31
4.3.1 Sequenciamento de nova geração alvo específico para painel de genes	31
4.3.2 Imuno-histoquímica	32
4.3.3 Análise estatística	33
4.4 Segunda parte: Sequenciamento completo do exoma e sequenciamento de Sanger	33
4.4.1 Sequenciamento completo do exoma	33
4.4.2 Análise de bioinformática	34
5 RESULTADOS.....	36
5.1 Primeira parte: Sequenciamento de nova geração alvo específico para painel de genes e imuno-histoquímica.....	36
5.1.1 Pacientes e Amostras.....	36
5.1.2 Sequenciamento de nova geração alvo específico para painel de genes	36
5.1.3 Imuno-histoquímica	41
5.2 Segunda parte: Sequenciamento completo do exoma e sequenciamento de Sanger	43
5.2.1 Sequenciamento completo do exoma	43

5.2.2 Sequenciamento de Sanger	44
6 DISCUSSÃO	51
7 CONCLUSÃO	56
REFERÊNCIAS.....	57
APÊNDICES	64

1 INTRODUÇÃO

O tumor de células granulares (TCG) é uma neoplasia benigna rara de tecido mole. A histopatogênese do TCG é alvo de constantes discussões, sendo inicialmente proposta uma origem derivada das células do músculo esquelético (BILLERET LEBRANCHU, 1999; ORDÓÑEZ, 1999; ORDÓÑEZ; MACKAY, 1999). Atualmente, a origem dessa lesão é considerada neural, derivada de células de Schwann, sendo tal origem apoiada pela imunopositividade das células neoplásicas para S-100 (KURTIN; BONIN, 1994; MACHADO et al., 2016; VERED; CARPENTER; BUCHNER, 2008).

O TCG pode afetar várias partes do corpo, principalmente a pele e a cavidade oral. Na cavidade oral, a localização principal é a língua, com uma ligeira preferência pelo sexo feminino, com pico de incidência entre a quarta e sexta décadas de vida (SPEIGHT, 2005; VERED; CARPENTER; BUCHNER, 2008). O TCG geralmente se apresenta como uma única lesão assintomática não encapsulada que pode se infiltrar no tecido conjuntivo adjacente (EGUIA et al., 2006; VAN DE LOO et al., 2015). No entanto, pode apresentar-se como tumores múltiplos e, embora extremamente rara a sua forma maligna já foi descrita (EGUIA et al., 2006; SPEIGHT, 2005; VAN DE LOO et al., 2015). É esperada uma baixa taxa de recorrência do TCG após a excisão cirúrgica do tumor (SENA COSTA et al., 2012; TOBOUTI et al., 2017). Histologicamente, o TCG caracteriza-se por uma proliferação de células poligonais a fusiformes, com citoplasma granular eosinofílico abundante, pequeno núcleo vesicular, com ou sem hiperplasia pseudoepiteliomatosa (FLETCHER, 2013; VERED; CARPENTER; BUCHNER, 2008).

Existem poucos estudos moleculares sobre TCG (RICKERT; PAULUS, 2002), sendo a maioria concentrada em análises imuno-histoquímicas e ultraestruturais (VERED; CARPENTER; BUCHNER, 2008). O trabalho de Gomes; Fonseca-Silva; Gomez (2013), demonstrou perda de heterozigidade (LOH) em TCG oral, na região dos genes supressores de tumor *TP53* e *P16*, um fenômeno anteriormente considerado exclusivo de tumores malignos. A ocorrência de múltiplos TCG foi relatada em síndromes como LEOPARD e Noonan, em que os indivíduos apresentam mutação no gene *PTPN11* (BAMPS et al., 2013; PARK; LEE, 2017; RAMASWAMY et al., 2010; SCHRADER et al., 2009), além de ter sido relatada na

síndrome dos hamartomas múltiplos com mutação do gene *PTEN* (MARCHESE et al., 2003).

Recentemente, mutações nos genes do complexo vacuolar (H^+)-ATPase (V-ATPase) foram identificadas como uma possível assinatura molecular de TCGs. Especificamente, essas mutações ocorreram nos genes *ATP6AP1* e *ATP6AP2* (PAREJA et al., 2018; SEKIMIZU et al., 2019) e no gene *ATP6V0C* (SEKIMIZU et al., 2019). No entanto, os eventos moleculares que atuam como condutoras (do inglês *drivers*) na patogênese dos TCGs orais ainda não estão bem estabelecidos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Tumor de células granulares

Os primeiros relatos na literatura de lesões similares ao tumor de células granulares ocorreram em 1854 quando Weber e Virchow descreveram casos que apresentavam acúmulo de grandes células com citoplasma eosinofílico granular localizado na língua (VIRCHOW, 1854; WEBER; VIRCHOW, 1854). Entretanto, Abrikossoff é conhecido como o primeiro a relatar em 1926 o caso de um paciente que apresentou essa neoplasia localizada na língua (ABRIKOSSOFF, 1926). Após estudar um número maior de casos de TCG, ele concluiu que o tumor se originava das células do músculo esquelético e, por isso, o nomeou mioblastoma (ABRIKOSSOFF, 1931).

Desde então, a histogênese dessa lesão vem sendo amplamente discutida e a sua origem já foi atribuída a diversos tipos celulares como mioblastos, histiócitos, fibroblastos, células da bainha neural, células neuroendócrinas e células mesenquimais indiferenciadas (GURZU et al., 2015; KAISERLING; RUCK; XIAO, 1995; ORDÓÑEZ, 1999; STEWART et al., 1988; WILLIAMS; WILLIAMS, 1997). Devido à controvérsia da sua origem, vários nomes foram propostos para essa lesão: tumor de Abrikossoff, neuroma de célula granular, neurofibroma de célula granular e schwannoma de célula granular (BILLERET LEBRANCHU, 1999; EGUIA et al., 2006; ORDÓÑEZ, 1999). Atualmente, é usado o termo tumor de células granulares de acordo com a classificação de tumores de cabeça e pescoço da Organização Mundial de Saúde (OMS) (ALLEN; GNEPP; RO, 2017).

A origem do tumor de células granulares é atribuída às células de Schwann devido a imunopositividade para S-100, enolase neurônio específica, CD57, CD68 e proteínas da mielina do nervo periférico (P0 e P2) (CHRYSOMALI et al., 1997; FRANCO et al., 2017; KURTIN; BONIN, 1994; MUKAI, 1983; WILLIAMS; WILLIAMS, 1997).

Apesar do TCG já ter sido descrito em pacientes de diversas idades, incluindo casos congênitos (epúlida congênita do recém-nascido, ele geralmente ocorre entre a quarta e sexta décadas de vida (FLETCHER, 2013; LACK et al., 1980; SPEIGHT, 2005). Normalmente, o TCG acomete mais mulheres do que homens na proporção de 2:1 (ORDÓÑEZ, 1999; SPEIGHT, 2005), no entanto, estudos mais

recentes mostram que esse número pode variar (ALOTAIBY et al., 2019; BECELLI et al., 2001; BILLERET LEBRANCHU, 1999; JOBRACK; GOEL; COTLAR, 2018; TORRIJOS-AGUILAR et al., 2009; VAN DE LOO et al., 2015).

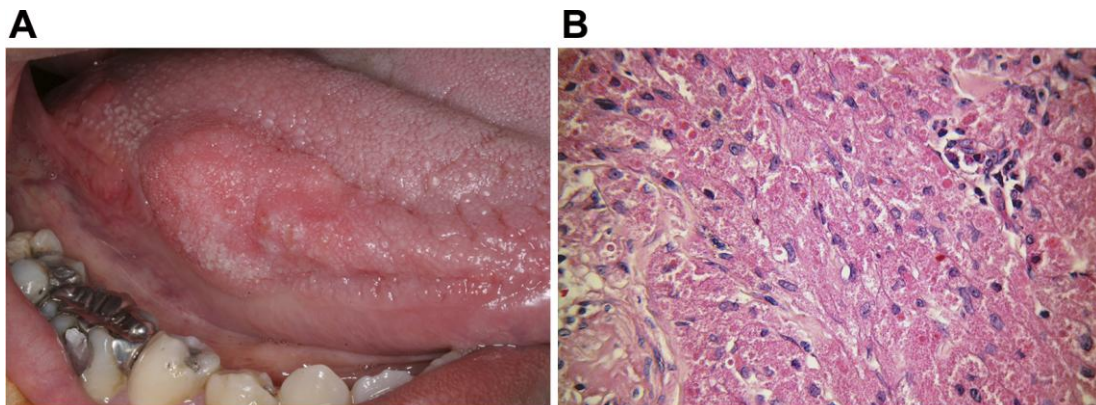
Essa neoplasia pode afetar qualquer parte do corpo sendo que aproximadamente 50% dos casos acontecem na região de cabeça e pescoço, e na maioria dos casos de TCG a língua o principal local acometido, seguido da mucosa jugal (EGUIA et al., 2006; NEVILLE et al., 2009; VERED; CARPENTER; BUCHNER, 2008). No entanto, outros locais como a pele, tecidos subcutâneos e trato gastrointestinal já foram descritos como o local de maior incidência dessa lesão (BILLERET LEBRANCHU, 1999; FANBURG-SMITH et al., 1998; MOTEN et al., 2018).

Clinicamente, esta neoplasia se apresenta em boca como uma pápula ou nódulo, assintomático, de base séssil, de coloração rosada ou amarela, com evolução lenta (FIGURA 1A) (ALLEN; GNEPP; RO, 2017; NEVILLE et al., 2009).

Esse tumor é em sua grande maioria benigno, sendo que os casos malignos representam menos do que 2% de todos os TCG (MACHADO et al., 2016). Há somente um relato de TCG benigno do colón sigmoide que parece ter se transformado em maligno, apesar de não ter sido realizada biópsia do tumor na colonoscopia exploratória (CHOI et al., 2014).

Tipicamente, o TCG é uma lesão solitária, embora quase 25% dos casos reportados sejam lesões múltiplas (MACHADO et al., 2016). Algumas síndromes como LEOPARD e Noonan apresentam múltiplos tumores de células granulares e são associadas com mutação do gene *PTPN11* (MARTIN et al., 1990; SCHRADER et al., 2009; TOMSON; ABDULLAH; TAN, 2006). Além das síndromes de Cowden e Bannayan-Riley-Ruvalcaba foram apontadas como síndrome dos hamartomas múltiplos com mutação do gene *PTEN* (MARCHESE et al., 2003). Histologicamente, os TCG são caracterizados pela presença de lençóis e cordões de células grandes, poligonais, redondas ou alongadas, contendo citoplasma granular abundante e eosinofílico (ORDÓÑEZ; MACKAY, 1999). Os grânulos são ácido periódico de Schiff (PAS) positivo e resistente à diastase (YOGESH; SOWMYA, 2011). Comumente, os ninhos de células granulares são parcialmente separados por bandas de tecido conjuntivo, necrose e mitoses são geralmente ausentes (FIGURA 1B).

Figura 1 – Apresentação clínica e histopatológica do tumor de células granulares oral



Fonte: Professor Ricardo Santiago Gomez.

A) Lesão nodular, séssil na língua. **B)** Lençóis de células poligonais a fusiformes com citoplasma granular eosinofílico abundante e pequeno núcleo vesicular. (Hematoxilina e Eosina, x40).

A confirmação do diagnóstico dessa lesão é histopatológica. Alguns tumores benignos do tecido conjuntivo, adiposo e neural, como fibromas, lipomas, neuromas, neurofibromas ou schwannomas devem ser considerados como diagnósticos diferenciais clínicos (ORDÓÑEZ; MACKAY, 1999). O tratamento para o TCG é a remoção cirúrgica da lesão, com raros casos de recidiva (NEVILLE et al., 2009).

Ultraestruturalmente, os grânulos intracitoplasmáticos presentes no TCG parecem resultar da formação intracelular de mielina fagocitada por lisossomos (autodigestão) (BEDETTI et al., 1983; FISHER; WECHSLER, 1962; MITTAL; TRUE, 1988) e, de fato, os TCGs mostram a presença dos lisossomos associados à glicoproteína CD68 (KURTIN; BONIN, 1994). Além disso, com base na imunorreatividade de TCGs para LC3, um marcador de autofagia, os grânulos intracitoplasmáticos de TCG são considerados autofagossomos ou autofagolisossomos (SHINTAKU, 2011).

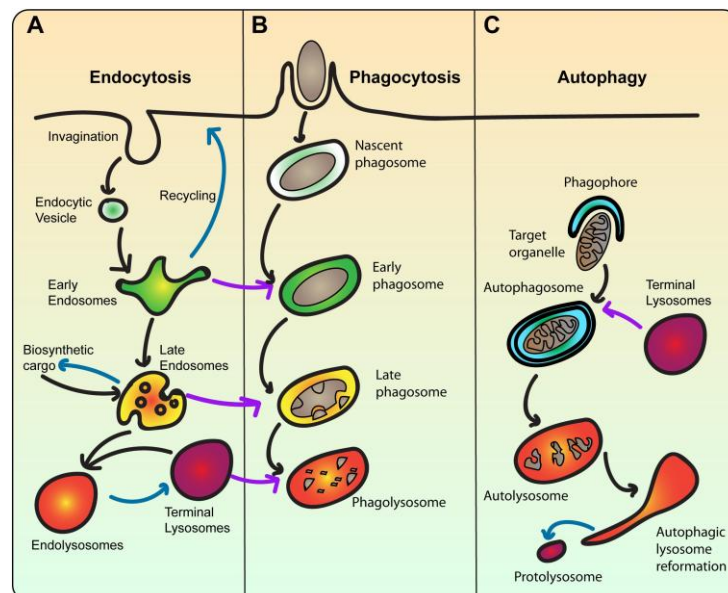
Mutações em genes do complexo V-ATPase (PAREJA et al., 2018; SEKIMIZU et al., 2019) reforçam essa hipótese uma vez que esse complexo funciona como uma bomba de prótons responsável pela acidificação de compartimentos intracelulares, incluindo o pH ácido do lúmen do lisossomo (MINDELL, 2012).

Considerando-se que os eventos moleculares que funcionam como condutores na patogênese do tumor de células granulares orais ainda são desconhecidos, a elucidação do perfil molecular dessa neoplasia se torna necessária. Além disto, um entendimento da biologia dos tumores benignos pode fornecer informações cruciais para o completo entendimento da tumorigênese (MARINO-ENRIQUEZ; FLETCHER, 2014).

2.2 Lisossomos e Complexo V-ATPase

Os lisossomos são organelas intracelulares responsáveis pela degradação e reciclagem de macromoléculas incluindo carboidratos, lipídios, ácidos nucleicos e proteínas, via endocitose e fagocitose (material extracelular) e via autofagia (material intracelular) (FIGURA 2) (LUZIO; PRYOR; BRIGHT, 2007; SCHRÖDER et al., 2010).

Figura 2 – Representação esquemática da participação do lisossomo nas vias de digestão celular



Fonte: (INPANATHAN; BOTELHO, 2019).

(A) Durante a endocitose, a membrana plasmática invagina e forma as vesículas endocíticas, essas por sua vez, se fundem com o endossomo primário, que seleciona a molécula-carga para reciclagem de volta à membrana plasmática ou degradação nos lisossomos. Simultaneamente, os endossomos primários amadurecem em corpos multivesiculares que depois se tornam endossomos secundários e recebem a molécula-carga recém-sintetizada e se fundem com os lisossomos terminais, que são reservas não ácidas de enzimas hidrolíticas para formar um endolisossomo. **(B)** Na fagocitose,

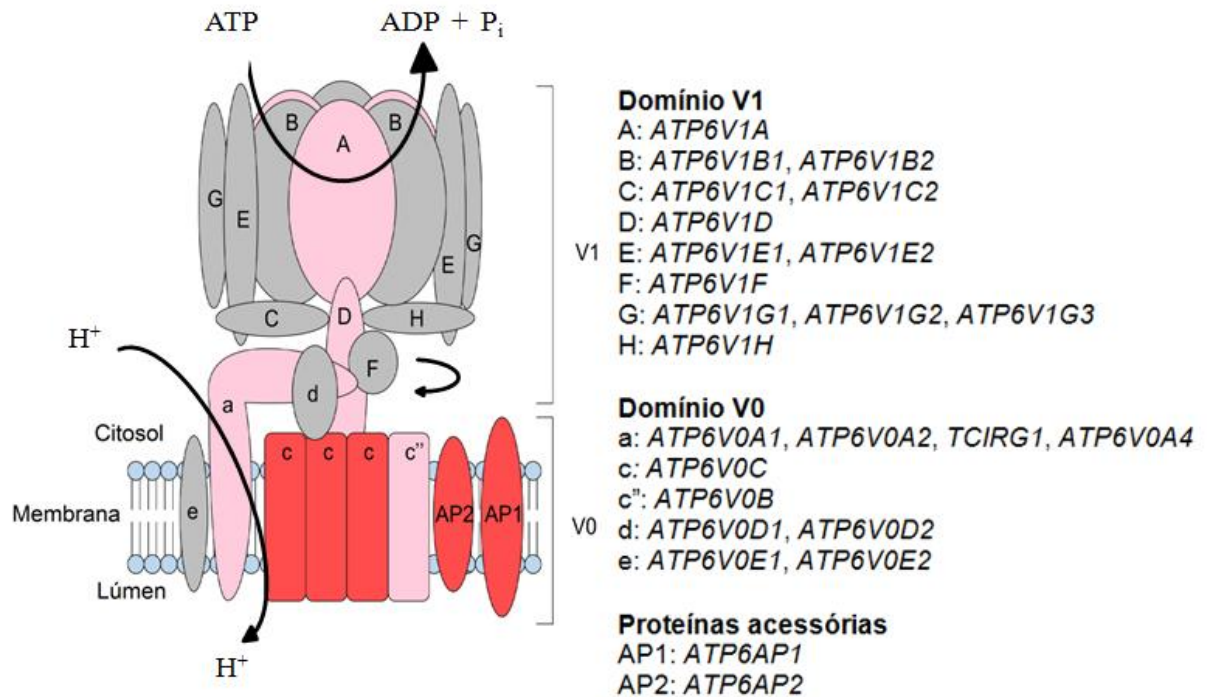
partículas extracelulares como bactérias são englobadas pela membrana plasmática e formam o fagossomo. Acredita-se que o fagossomo amadurece por fusão sequencial com endossomos primário e secundário e lisossomo. **(C)** Na autofagia, a organela alvo é envolvida pelo fagóforo, formando o autofagossomo que passa por um processo de maturação, e se funde com o lisossomo. Com a degradação da molécula, o autolisossomo passa por uma reestruturação e gera o protolisossomo que elimina conteúdo do autofagossomo e restaura o lisossomo.

Os lisossomos possuem um lúmen ácido de pH 4.5 a 5 mantido pelo complexo V-ATPase, esse pH ácido é essencial para o funcionamento das mais de 60 proteínas presentes no lúmen do lisossomo como hidrolases ácidas (proteases, glicosidases, sulfatases, lípases, nucleases, etc) e outras proteínas ativadoras (CHAPEL et al., 2013; MINDELL, 2012). A membrana do lisossomo é constituída por proteínas de membrana e proteínas relacionadas ao tráfego e fusão, transporte e canais de íons (BONAM; WANG; MULLER, 2019; SCHWAKE; SCHRÖDER; SAFTIG, 2013).

Vacuolar H⁺-ATPase ou complexo V-ATPase é uma bomba de prótons dirigida por ATP localizado nas membranas de organelas intracelulares e na membrana plasmáticas de alguns tipos de células (FORGAC, 2007; MCGUIRE et al., 2016). Esse complexo é composto por 13 multi-subunidades divididas em dois domínios, V1 hidrólise do ATP e V0 transporte de prótons (FIGURA 3) e tem a função de acidificar o lúmen de organelas intracelulares que participam da via endocítica e exocítica, incluindo lisossomos, endossomos e vesículas secretoras, responsáveis pelo tráfego de membrana, processamento e degradação de macromoléculas, transporte acoplado de pequenas moléculas e na entrada de agentes patogênicos como vírus e bactérias (CIPRIANO et al., 2008; HOLLIDAY, 2017).

Além disso, o complexo V-ATPase localizado na membrana plasmática de certas células como osteoclastos, macrófagos, células renais, células do epidídimo e certas células tumorais, acidificam espaços extracelulares contribuindo assim para reabsorção óssea, homeostase do pH, acidificação urinária, desenvolvimento e maturação do esperma e invasão celular, respectivamente (COTTER et al., 2015; FORGAC, 2007; WHITTON et al., 2018).

Figura 3 – Desenho esquemático do complexo V-ATPase



Fonte: SEKIMIZU *et al.*, 2019

O complexo V-ATPase é composto de múltiplas subunidades organizados em dois domínios V1 e V0. O domínio V1 é periférico, localizado no lado citoplasmático da membrana, realiza a hidrólise do ATP e é composto por oito subunidades (A-H). O domínio V0 é integral, responsável pelo transporte de prótons através da membrana, consiste em cinco tipos de subunidades (a, c, c'', d e e). As subunidades B, C, E, G, a, d e e têm múltiplas isoformas. Além disso, duas proteínas acessórias (codificadas por *ATP6AP1* e *ATP6AP2*) acompanham essas subunidades dos domínios principais (V1 e V0).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar a existência de mutações genéticas patogênicas no tumor de células granulares orais.

3.2 Objetivos específicos

Investigar 2.856 mutações *hotspot* em 50 genes supressores de tumor e oncogenes comumente alterados em neoplasias humanas, incluindo *PTPN11* e *PTEN*, por meio do sequenciamento de nova geração alvo específico para painel de genes.

Avaliar a imunexpressão das proteínas associadas às vias de sinalização de genes com mutação patogênica.

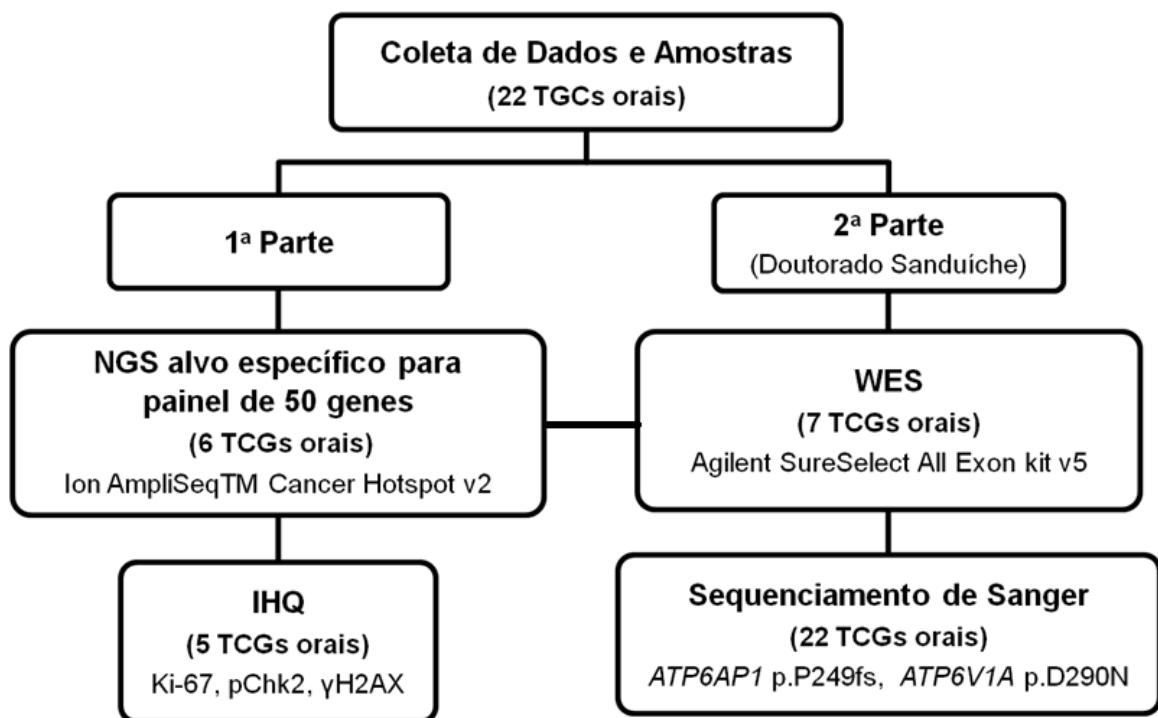
Identificar, mutações gênicas recorrentes que sejam capazes de conferir uma assinatura molecular aos tumores de células granulares orais por meio do sequenciamento completo do exoma.

Validar as mutações patogênicas recorrentes encontradas no sequenciamento completo do exoma por meio do sequenciamento direto de Sanger e investigar estas mutações em um coorte expandido.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Esse estudo utilizou uma amostra de conveniência, com um número variado de amostras para diferentes técnicas de biologia molecular. Todas as amostras foram TCG esporádicos, localizados em língua e, em um único caso, em mucosa labial. Com o objetivo de facilitar a compreensão da metodologia, o trabalho foi dividido em duas partes (FIGURA 4). Primeiramente foi realizado sequenciamento de nova geração (do inglês *Next Generation Sequencing*, NGS) alvo específico para painel de 50 genes e Imuno-Histoquímica (IHQ). A segunda parte consistiu no sequenciamento completo do exoma (do inglês *Whole Exome Sequencing*, WES) em um coorte de descoberta e o sequenciamento de Sanger para investigar em um coorte expandido a presença de mutações detectadas neste coorte de descoberta. Esta segunda parte foi realizada durante o estágio de um ano de doutorado sanduiche no The Research Institute of the McGill University Health Centre (RI-MUHC) em Montreal, Canadá, sob a supervisão da professora Dr^a Nada Jabado.

Figura 4 – Fluxograma da metodologia do trabalho



Representação esquemática da divisão da metodologia desse estudo. Após coleta de dados clínicos e confirmação histopatológica do diagnóstico, 6 amostras de TCGs orais foram selecionadas para o NGS alvo específico para um painel de 50 genes. Em seguida, 5 dessas amostras foram usadas para imuno-histoquímica com os marcadores Ki-67,

Phospho-Chk2 (pChk2) e Phospho-histone H2AX (γ H2AX). Na segunda parte, foi realizado WES com 7 amostras (6 TCGs orais usados na 1ª parte, mais uma nova amostra de TCG oral). Posteriormente foi realizado sequenciamento de Sanger em 22 TCGs orais com primers específicos para as regiões das variantes *ATP6AP1* p.P249Hfs*4 e *ATP6V1A* p.D290N.

4.1 Seleção amostral

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (CAEE: 88001018.9.0000.5149) e as amostras obtidas dos arquivos do Serviço de Patologia Oral da Universidade Federal de Minas Gerais, Universidade Federal da Bahia e Universidade Federal de Sergipe. Foram incluídas neste estudo amostras de pacientes de ambos os sexos e de todas as idades com diagnóstico clínico e histológico de tumor de células granulares que apresentavam lâminas coradas em H&E (Hematoxilina-Eosina) para confirmação do diagnóstico e blocos com quantidade suficiente de tecido. Após a confirmação do diagnóstico por dois patologistas (R.S.G. e C.C.G.), foi selecionado um conjunto de conveniência de 22 casos de TCGs orais, todos fixados em formol e incluídos em parafina (do inglês *Formalin Fixed Paraffin Embedded*, FFPE).

4.2 Extração de DNA

Os tecidos FFPE foram microdissecados para promover o enriquecimento de tumor e cortados manualmente em micrótomo. Foram usados, aproximadamente, 10 cortes de 10 μ m de espessura para cada amostra. O DNA genômico (gDNA) foi isolado usando o QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen, Inc., Valencia, CA, EUA) de acordo com o protocolo do fabricante. Resumidamente, o processo de extração consistiu em desparafinização por solução desparafinadora e digestão enzimática por meio da proteinase K e buffer ATL. A quantificação do DNA e a pureza foram determinados pelo Qubit 3.0 Fluorometer (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) e NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, EUA), respectivamente.

4.3 Primeira Parte: Sequenciamento de nova geração alvo específico para painel de genes e imuno-histoquímica

4.3.1 Sequenciamento de nova geração alvo específico para painel de genes

Na primeira etapa deste projeto, foi realizado o sequenciamento de nova geração em seis amostras de TCGs orais utilizando o painel Ion AmpliSeq™ Cancer Hotspot v2 (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). Este painel consiste no preparo de uma biblioteca de 207 amplicons com comprimento médio de 154pb, que incluem 2.856 mutações *hotspot* em 50 genes frequentemente mutados em câncer: *ABL1, AKT1, ALK, APC, ATM, BRAF, CDH1, CDKN2A, CSF1R, CTNNB1, EGFR, ERBB2, ERBB4, EZH2, FBXW7, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FLT3, GNA11, GNAS, GNAQ, HNF1A, HRAS, IDH1, JAK2, JAK3, IDH2, KDR, KIT, KRAS, MET, MLH1, MPL, NOTCH1, NPM1, NRAS, PDGFRA, PIK3CA, PTEN, PTPN11, RB1, RET, SMAD4, SMARCB1, SMO, SRC, STK11, TP53, VHL*.

O kit Ion AmpliSeq™ Library 2.0 (Life Technologies) foi usado para gerar bibliotecas de DNA. Cada biblioteca foi construída usando 30 ng de gDNA . Este gDNA foi amplificado por PCR multiplex usando Ion AmpliSeq™ Primer Pool (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) e codificado com o kit IonXpress™ Barcode Adapters 1-16 (Life Technologies). As bibliotecas foram individualmente purificadas com esferas Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, Inc. Indianapolis, IN, EUA). Antes de agrupar as bibliotecas em uma solução única, cada biblioteca foi quantificada por qPCR com o Kit de Quantificação TaqMan™ (Life Technologies). Diluições individuais em água livre de nuclease foram realizadas a fim de assegurar a concentração final de 100 pM do pool.

A PCR de Emulsão foi realizada no Sistema Ion OneTouch™2 (Life Technologies). As amostras foram submetidas ao controle de qualidade, usando o teste *Ion Sphere™ quality control* e aquelas adequadas foram enriquecidas no *OneTouch™ ES* de acordo com as instruções do fabricante. O sequenciamento foi realizado utilizando chip kit Ion 316™ (Life Technologies) no sistema Ion Personal Genome Machine® (PGM™) (Life Technologies).

As leituras foram alinhadas com o genoma de referência humano hg19 e foram filtradas as variantes de nucleotídeo único (do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*, SNV), variantes em múltiplos nucleotídeos (do inglês *multi-nucleotide*

variant, MNV) e inserção/deleção (do inglês *Insertion/Deletion*, INDEL) usando o software Ion Reporter™ versão 5.2 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EUA). Além disso, os efeitos de variantes foram anotados como: inserção *nonframeshift*, inserção *frameshift*, deleção *nonframeshift*, deleção *frameshift*, *stoploss*, *missense*, *nonsense*. O *Integrative Genomics Viewer* (IGV 2.3) foi usado para verificar manualmente os alinhamentos de cada variante para excluir falsos positivos (ou seja, regiões de homopolímero e sequências desalinhada), verificando a qualidade da base e do mapeamento. Variantes lidas em alta profundidade (profundidade mínima de x100 leituras) com uma frequência maior que 5% foram reportadas.

A predição *in silico* do efeito funcional das variantes foi realizada usando SIFT (do inglês *Sorting Tolerant From Intolerant*) acessado em <http://sift.jcvi.org/>, cujos escores predizem se uma substituição de aminoácido afeta a função da proteína, e PolyPhen2 (do inglês, *Polymorphism Phenotyping v2*) acessado em <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), uma ferramenta de previsão do efeito funcional de uma variante em uma proteína. O ClinVar, um arquivo público de acesso livre que agrega informações sobre o significado clínico da variação genômica, foi usado para avaliar o impacto clínico das variantes (acessado em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>).

4.3.2 Imuno-histoquímica

A amostra TCG oral 1 apresentou mutação em *ATM* p.Ala2883Val, essa variante foi predita como deletéria pela análise *in silico* de *SIFT* e *PolyPhen-2*. Para investigar o efeito deletério da mutação *ATM*, foi analisada a imunexpressão de dois substratos de sua via nas mesmas amostras de TCGs orais utilizadas nos experimentos NGS, exceto #TCG oral 6, devido à quantidade insuficiente de material. Além disso, avaliou-se a imunomarcagem de Ki-67 para estimar o índice de proliferação celular nessas lesões. Foram utilizados os anticorpos primários Phospho-Chk2-Thr68 (pChk2), (clone C13C1, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EUA) na diluição 1:50, Phospho-Histona H2AX Ser139 (γH2AX), (clone 20E3, Cell Signaling Technology) na diluição de 1:400 e Ki-67 (clone MIB-1, Dako, Glostrup, Dinamarca) na diluição de 1:50. Solução Trilogy (Cell Marque, Koclin, CA, EUA) foi utilizada como recuperação antigênica (pChk2 e γH2AX) e ácido cítrico a

pH 6,0 para Ki-67. Lâminas de carcinoma de células escamosas orais com imunorreatividade conhecida para os anticorpos foram incluídas como controle positivo; e controles negativos consistiram na omissão de anticorpos primários. As reações foram visualizadas utilizando um sistema baseado em polímeros, o sistema de ligação dupla HRP EnVision e a diaminobenzidina (Dako, Carpinteria, CA, EUA) como cromógeno.

A imunexpressão foi avaliada pela contagem da positividade da coloração nuclear em células tumorais em oito campos (aumento de 400x) por dois observadores diferentes (J.A.F. e L.M.G.) com início a partir da área do tumor com maior imunopositividade. Foi realizada uma calibração prévia entre os observadores e calculado um percentual médio de marcação nos oito campos por amostra e por examinador através do somatório das células tumorais positivas dos oito campos dividido pelo total de células tumorais positivas e negativas dos oito campos. Posteriormente, foi obtida a média de positividade entre as contagens dos dois examinadores por amostra e por anticorpo.

4.3.3 Análise estatística

O software IBM SPSS Statistics para Windows, Versão 21.0 (Armonk, NY: IBM Corp.) foi utilizado para avaliar a normalidade dos dados pelos testes de Shapiro-Wilk. A concordância entre os dois observadores foi realizada de acordo com correlação de Pearson (r). A correlação entre a contagem dos dois observadores por amostra e marcador foi avaliada por Spearman (ρ) para Ki-67 e por Pearson (r) para pChk2 e γ H2AX. O nível de significância foi estabelecido em 0,05.

4.4 Segunda parte: Sequenciamento completo do exoma e sequenciamento de Sanger

4.4.1 Sequenciamento completo do exoma

O WES permite investigar mutações em regiões codificantes do genoma, i.e., exons. Ele abrange cerca de mutações em 20.794 genes e 201.121 exons em

cada amostra, sendo muito mais abrangente do que o painel de 50 genes usado na primeira parte do estudo.

Inicialmente, 22 amostras de TCG orais foram enviadas para o WES. No entanto, várias amostras de gDNA/bibliotecas não passaram no controle de qualidade (QC, do inglês *quality control*). Portanto, o WES foi realizado em sete amostras de TCGs orais de seis pacientes. Os exomas foram capturados usando o kit Agilent SureSelect All Exon v5, de acordo com as instruções do fabricante. As bibliotecas enriquecidas foram sequenciadas no Illumina HiSeq 2500 com leituras de 125bp *paired-end reads* (sequenciamento de extremidade pareada, ou seja, as duas extremidades de um fragmento são sequenciadas).

4.4.2 Análise de bioinformática

As leituras foram mapeadas para o genoma de referência humano (hg19) com Burrows – Wheeler Aligner (LI; DURBIN, 2009), e as leituras duplicadas foram sinalizadas usando Picard (<http://picard.sourceforge.net>) e excluídas de análises posteriores. As variantes foram chamadas usando três chamadas de variantes diferentes, incluindo SAMtools mpileup (LI et al., 2009), freebayes versão v1.1.0-4-gb6041c6 (GARRISON; MARTH, 2012) e GATK haplotype caller versão 3.8 (MCKENNA et al., 2010). Foram consideradas as variantes que apareceram em pelo menos duas das três chamadas e que apresentaram profundidade mínima de 10 *reads* e frequência alélica da variante igual e/ou maior do que 10% (do inglês *Variant Allele Frequency*, VAF). As mutações foram anotadas usando ANNOVAR (WANG; LI; HAKONARSON, 2010) e scripts personalizados. As variantes anotadas foram filtradas contra os polimorfismos comuns da linhagem germinativa presentes no dbSNP135, o projeto 1000 Genomes (ALTSHULER et al., 2010). As variantes dos genes do complexo V-ATPase foram inspecionadas sistemicamente no *Integrative Genomics Viewer* (IGV) para garantir que o processamento de bioinformática não perdeu nenhuma variante devido à baixa VAF. Devido ao grande volume de dados gerados pelo WES, inicialmente foram filtradas as variantes que apresentaram frequência do menor alelo abaixo de 0.01 (do inglês *Minor Allele Frequency*, MAF) em seguida, foram selecionadas as variantes em genes do complexo V-ATPase e genes que participam da via do lisossomo/autofagossomo/autofagia. Após isso, foram identificadas as variantes patogênicas recorrentes.

4.4.3 Sequenciamento de Sanger

O sequenciamento de Sanger foi usado para validar no coorte de descobrimento (n=7) as variantes *ATP6AP1* p.P249Hfs*4 e *ATP6V1A* p.D290N detectadas por WES. Além disto, uma amostra expandida de 15 TCGs orais foi utilizada para o sequenciamento alvo dessas mutações. Os *primers* foram desenhados usando o software online Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). *ATP6AP1* *forward*: 5'CAGGGCTGCTGAAAGAAGG3' e *reverse*: 3'GGGAGCGGTGTCATTGTAAC5'. *ATP6V1A* *forward*: 5'ATGTAGGATGTGGTGAAAGAGGA3' e *reverse*: 3'GCTCCAGACCCAACACAAAG5'. O tamanho do amplicon foi de 150 pares de base para ambos os genes.

As condições de PCR foram semelhantes para ambos os pares de *primers*. Para cada amostra foi utilizado 200ng de gDNA, 10µM de primer forward e reverse, 12,5µl do reagente *MyTaq HS Red Mix* (Bioline, Londres, GBR) e H₂O destilada e deionizada, totalizando um volume final de 25µL. As condições de PCR foram semelhantes para ambos os pares de *primers*: desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos, 35 ciclos de (desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento a 60°C por 15 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos) e um período de extensão final a 72°C por 10 minutos. Os produtos da PCR foram então analisados em eletroforese em gel de agarose 1,5% e corante fluorescente *RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution* (Intron Biotechnology, Burlington, USA) e visualizadas em luz ultravioleta. Em seguida, os produtos de PCR foram purificados com o reagente *ExoSAP-IT™ Express* (Affymetrix, Inc) e depois sequenciados bidirecionalmente em um analisador de DNA ABI 3730XL (Applied Biosystems) com uso do polímero *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems) com 10pmol de *primer* e 20ng de *gDNA* purificado. O SnapGene v4.1.7 foi usado para visualizar os cromatogramas.

5 RESULTADOS

5.1 Primeira parte: Sequenciamento de nova geração alvo específico para painel de genes e imuno-histoquímica

Os resultados da primeira parte desse trabalho foram publicados na forma de artigo científico no periódico *Journal of Clinical Pathology*. (APÊNDICE A).

5.1.1 Pacientes e Amostras

Todas as seis amostras estavam localizadas na língua e ocorreram em pacientes do sexo feminino com idade variando de 18 a 42 anos (média de 34 anos) (TABELA 1).

Tabela 1 – Características clínicas e ensaios moleculares

Amostra #	Sexo	Idade (anos)	Localização	Experimento
TCG oral 1	F	22	Língua	<i>Targeted</i> NGS e IHQ
TCG oral 2	F	18	Língua	<i>Targeted</i> NGS e IHQ
TCG oral 3	F	36	Língua	<i>Targeted</i> NGS e IHQ
TCG oral 4	F	40	Língua	<i>Targeted</i> NGS e IHQ
TCG oral 5	F	42	Língua	<i>Targeted</i> NGS e IHQ
TCG oral 6	F	32	Língua	<i>Targeted</i> NGS

TCG: Tumor de Células Granular, F: Feminino, NGS: *Next-Generation Sequencing*, IHQ: Imuno-Histoquímica.

5.1.2 Sequenciamento de nova geração alvo específico para painel de genes

O número de bases sequenciadas nas seis amostras variou de 30.755.086 a 45.918.127, enquanto o número de leituras totais (comprimento médio de leitura de 111bp) variou de 281.528 a 418.838, a maioria com Phred Quality

score (medida da qualidade da identificação do número de bases geradas pelo NGS), $\geq Q20$ (= 99% de precisão da chamada base).

Após análise cuidadosa dos resultados, com a aplicação dos filtros descritos, e exclusão de falsas variantes, foram identificadas seis variantes: *KDR* (c.769G>A, p.Asp257Asn), *KDR* (c.1416A>T, p.Gln472His), *GNAQ* (c.718G>A, p.Val240Met), *ATM* (c.8648C>T, p.Ala2883Val), *SMO* (c.672G>T, p.Glu224Asp), *TP53* (c.215C>G, p.Pro72Arg). Todas as variantes identificadas são variantes de nucleotídeo único (SNV), com localização exônica e efeito missense. Informações detalhadas de cada variante estão listadas por amostra na Tabela 2.

Três das variantes filtradas estão listadas no Banco de Dados de Polimorfismo de Nucleotídeo Único (dbSNP; acessado em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>): *KDR* rs1870377, *SMO* rs148484943, *TP53* rs1042522. As variantes foram detectadas em uma frequência próxima a 50% ou a 100%, sugerindo SNPs heterozigotos e homozigotos. Por outro lado, a variante *SMO* rs148484943, mesmo com frequência próxima a 50%, foi predita como possivelmente deletério (PolyPhen2).

As variantes *KDR* (c. 769G>A, p.Asp257Asn), *GNAQ* (c.718G>A, p.Val240Met) e *ATM* (c.8648C>T, p.Ala2883Val) apresentaram uma frequência de 5,5%, 6,5% e 6,2%, respectivamente, e não são listadas no dbSNP ou como SNPs comuns no *The UCSC Genome Browser*. A mutação em *ATM* foi a única de efeito predito como deletério tanto pelo SIFT quanto pelo PolyPhen2. A captura de tela do IGV mostrando as três variantes preditas com efeito deletério em nível de proteína, seja por SIFT, PolyPhen2 ou em ambos, é mostrada na Figura 5.

Não foram identificadas variantes nos genes *PTEN* e *PTPN11*.

Tabela 2 – Variantes de nucleotídeo único detectados com uma profundidade de leitura superior a 100 vezes em tumor de células granulares oral

Caso/Locus	Gene	Frequência (%)	Transcrito	Variante	Mudança de aminoácido	SIFT	PolyPhen2	dbSNP	MAF (1000G)	ClinVar
TCG oral 1										
chr4:55980322	<i>KDR</i>	5.5	NM_002253.2	c.769G>A	p.Asp257Asn	Tolerado	Poss. deletério	ND	ND	NF
chr9:80409396	<i>GNAQ</i>	6.5	NM_002072.4	c.718G>A	p.Val240Met	Tolerado	Benigno	ND	ND	NF
chr11:108218069	<i>ATM</i>	6.2	NM_000051.3	c.8648C>T	p.Ala2883Val	Deletério	Prov. deletério	ND	ND	NF
chr17:7579472	<i>TP53</i>	100	NM_000546.5	c.215C>G	p.Pro72Arg	Tolerado	Benigno	rs1042522	0.398 (ref)	Benigno
TCG oral 2										
chr4:55972974	<i>KDR</i>	52	NM_002253.2	c.1416A>T	p.Gln472His	Tolerado	Benigno	rs1870377	0.235 (ref)	NF
chr17:7579472	<i>TP53</i>	51	NM_000546.5	c.215C>G	p.Pro72Arg	Tolerado	Benigno	rs1042522	0.398 (ref)	Benigno
TCG oral 3										
chr4:55972974	<i>KDR</i>	46	NM_002253.2	c.1416A>T	p.Gln472His	Tolerado	Benigno	rs1870377	0.235 (ref)	NF
chr17:7579472	<i>TP53</i>	100	NM_000546.5	c.215C>G	p.Pro72Arg	Tolerado	Benigno	rs1042522	0.398 (ref)	Benigno
TCG oral 4										
chr7:128845178	<i>SMO</i>	51	NM_005631.4	c.672G>T	p.Glu224Asp	Tolerado	Poss. deletério	rs148484943	0.0002* (ref)	NF
chr17:7579472	<i>TP53</i>	100	NM_000546.5	c.215C>G	p.Pro72Arg	Tolerado	Benigno	rs1042522	0.398 (ref)	Benigno

TCG oral 5

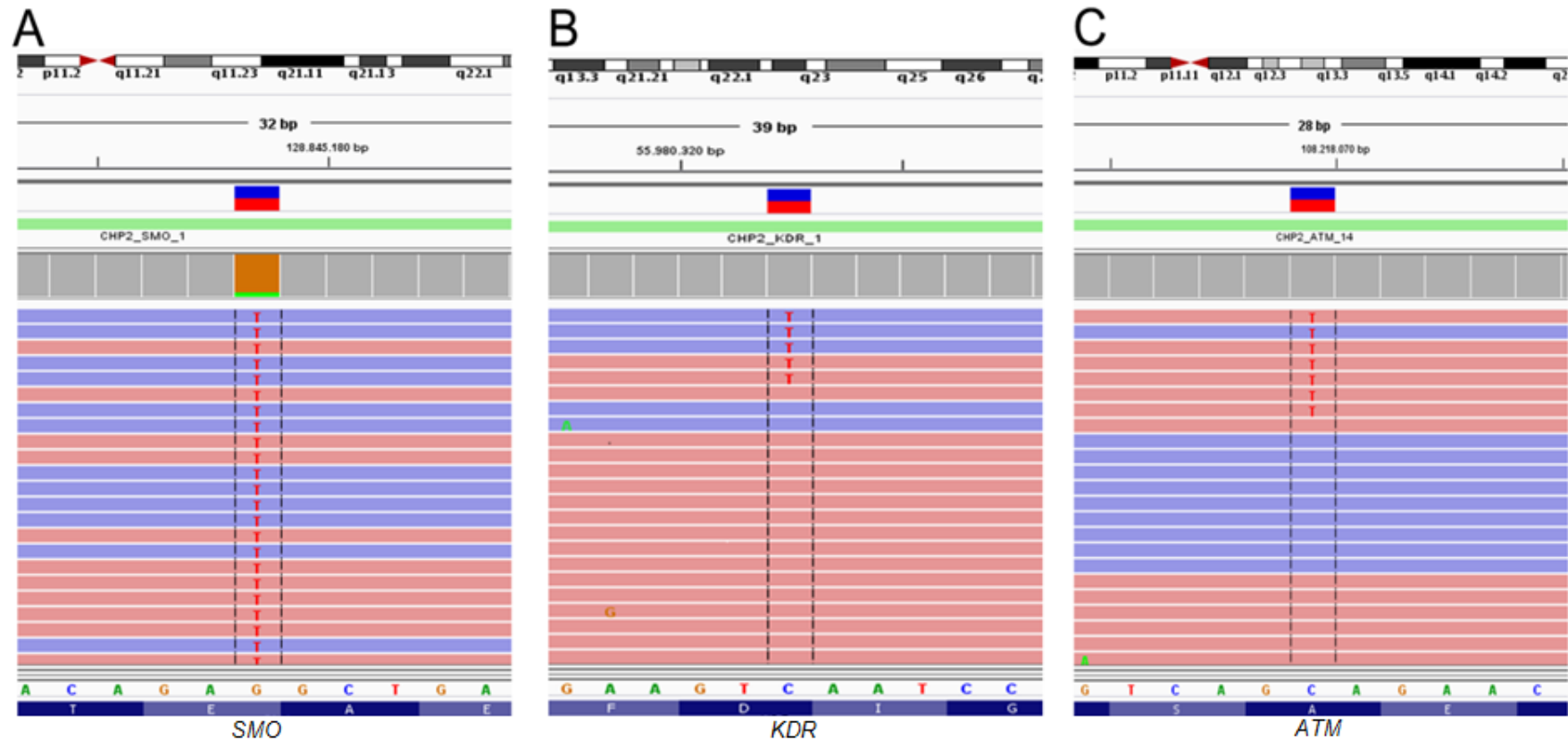
chr4:55972974	KDR	53	NM_002253.2	c.1416A>T	p.Gln472His	Tolerado	Benigno	rs1870377	0.235 (ref)	NF
chr17:7579472	TP53	54	NM_000546.5	c.215C>G	p.Pro72Arg	Tolerado	Benigno	rs1042522	0.398 (ref)	Benigno

TCG oral 6

chr17:7579472	TP53	97	NM_000546.5	c.215C>G	p.Pro72Arg	Tolerado	Benigno	rs1042522	0.398 (ref)	Benigno
---------------	------	----	-------------	----------	------------	----------	---------	-----------	-------------	---------

ND: Não disponível. NF: Não fornecido (incluem casos em que os dados não estão disponíveis ou são desconhecidos). MAF: Frequência do menor alelo (*Minor Allele Frequency*) frequência com que o segundo alelo mais comum ocorre em uma dada população. Disponível em: <http://www.1000genomes.org/>; *Dado do Consórcio de agregação do Exoma (*Exome Aggregation Consortium*). Disponível em: <http://exac.broadinstitute.org/>. dbSNP: Base de dados de variações genéticas de polimorfismo de nucleotídeo único (*Single Nucleotide Polymorphism Database of genomic variants*). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>; SIFT: Classificação de tolerado a intolerado (*Sorting Intolerant From Tolerant*) o SIFT prediz se a substituição do aminoácido afeta a função da proteína. Disponível em: <http://sift.jcvi.org/>; PolyPhen2: Fenotipagem do polimorfismo (*Polymorphism Phenotyping v2*) prediz o efeito funcional da proteína em uma variante. Disponível em: <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>; ClinVar: Avaliação do impacto clínico da variante. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>.

Figura 5 – Capturas de tela do IGV ilustrando leituras de variantes de nucleotídeo único deletórias nos genes *SMO*, *KDR* e *ATM*



A) *SMO* p.Glu224Asp, predito como tolerado pelo SIFT e possivelmente deletério pelo Polyphen2. **B)** *KDR* p.Asp257Asn, predito como tolerado por SIFT e possivelmente deletério pelo Polyphen2. **C)** *ATM* p.Ala2883Val, predito como deletério por SIFT e Polyphen2. Observe que as três variantes ocorreram nas duas fitas, *forward* e *reverse*, e que não há presença de artefatos na adjacência das variantes.

5.1.3 Imuno-histoquímica

Fotomicrografia representativa dos resultados da IHQ de TCG oral são mostrados na Figura 6. Todos os casos mostraram marcação nuclear e um padrão de imunomarcção baixo para a proteína Ki-67 e mediano para as proteínas pChk2 e γ H2AX. Os resultados das avaliações por examinador, amostra e anticorpo estão detalhados na Tabela 3. Uma forte concordância foi encontrada entre a contagem dos examinadores para as três proteínas analisadas, ($\rho=0,957$, $p<0,001$). A média da porcentagem de células imunopositivas para Ki-67 foi de 2,32% (intervalo 0,81%-4,37%) com uma alta correlação entre a contagem dos dois observadores (Spearman $\rho=0,900$, $p=0,037$). A média da porcentagem de células imunopositivas para pChk2 foi de 58,31% (intervalo 37,45%-90,19%) com alta correlação entre a contagem dos dois observadores (Pearson $r=0,999$, $p<0,001$). A média da porcentagem de células imunopositivas para γ H2AX foi de 42,86% (intervalo 24,79% - 51,26%) com uma alta correlação entre a contagem dos dois observadores embora não tenha sido estatisticamente significativa (Pearson $r=0,863$, $p=0,060$). A amostra TCG oral 1, que apresentou a mutação do *ATM*, foi a amostra que apresentou menor imunopositividade para as três proteínas avaliadas.

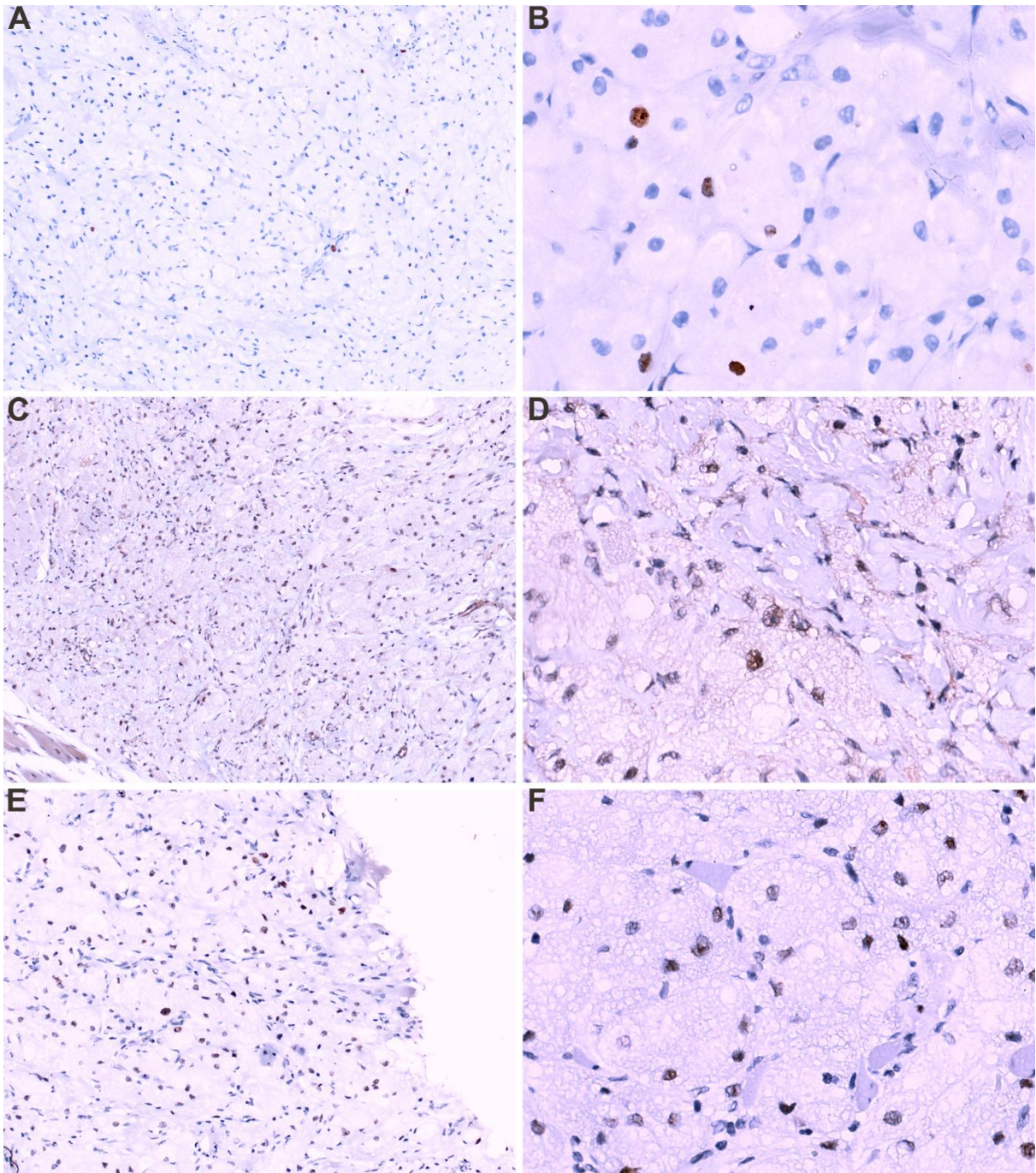
Tabela 3 – Resultado das médias das contagens de imuno-histoquímica em cada caso pelos dois examinadores

Amostras #	Ki-67 %		pChk2 %		γ H2AX %	
	(*1)	(*2)	(*1)	(*2)	(*1)	(*2)
TCG oral 1	1,15	0,46	38,08	36,81	24,39	25,18
TCG oral 2	1,40	1,26	66,27	63,39	50,04	47,30
TCG oral 3	1,46	1,18	45,71	44,10	35,56	36,66
TCG oral 4	5,22	2,34	54,19	54,20	50,31	56,62
TCG oral 5	5,37	3,37	90,49	89,89	43,26	59,25

*1: avaliador 1, *2: avaliador 2.

Destaque para TCG oral 1 além de apresentar mutação do gene *ATM* foi a amostra com menor positividade para os três marcadores.

Figura 6 – Perfil de imunomarcacão dos TCGs orais



Os TCGs orais apresentaram baixa imunopositividade para as proteínas Ki-67, pChk2 e γ H2AX. Imunomarcaco por Ki-67 **(A)** (x10) e **(B)** (x40). Substratos ativados pela cascata de sinalizaco ATM em resposta ao dano do DNA: pChk2 **(C)** (x10) e **(D)** (x40) e γ H2AX **(E)** (x10) e **(F)** (x40).

5.2 Segunda parte: Sequenciamento completo do exoma e sequenciamento de Sanger

5.2.1 Sequenciamento completo do exoma

Sete amostras de TCG oral que passaram no controle de qualidade, após a construção da biblioteca, foram analisadas por WES. Além dessas 7 amostras, 15 TCGs orais foram utilizados como um coorte de expansão para validação das mutações encontradas por WES *ATP6AP1* e *ATP6V1A* por meio do sequenciamento de Sanger. As informações clínicas de cada caso são mostradas na Tabela 4. A idade dos pacientes variou de 10 a 61 anos (média de 32 anos), 17 das 22 amostras eram de pacientes do sexo feminino. Todas as amostras estavam localizadas na língua com exceção de um caso que ocorreu em mucosa labial. Os casos TCG oral 5 e TCG oral 10 foram divididos em A e B uma vez que os pacientes apresentaram tumores bilaterais de língua e ambos foram sequenciados. Microscopicamente, todas as amostras mostraram a proliferação de células poligonais para fusiformes, com citoplasma granular eosinofílico abundante.

Os TCGs orais mostraram variantes nos seguintes genes do complexo V-ATPase: *ATP6AP1* deleção *frameshift* c.746_749del, resultando em p.P249Hfs*4 na amostra TCG oral 1 com frequência alélica de 23.3% (96/413 reads), e *ATP6V1A* *nonsynonymous* c.G868A, resultando em p.D290N no TCG oral 2 com frequência alélica de 20% (2/10 reads). (TABELA 4, FIGURA 7A e 7B). Nenhuma dessas variantes foi identificada em um banco de dados interno de aproximadamente 3.000 exomas previamente sequenciados e não foram reportadas anteriormente, não sendo catalogados em nenhum banco de dados populacional (GnomAD e 1.000 genomas) ou em banco de dados das variantes *The Human Gene Mutation Database* (HGMD) e ClinVar (impacto clínico da variante). Outras variantes genéticas raras foram detectadas nos genes do complexo V-ATPase (*ATP6V0E2* rs145697964, *ATP6V1G1* rs61742531, *ATP6V1G3* rs76330087), mas com base em suas frequências relativas na população em geral (MAF>0,01) e na falta de potencial impacto funcional pela análise *in silico* (*SIFT*, *PolyPhen2* e *Mutation Taster*), não focamos nestas variantes nas etapas de validação e investigação no coorte de expansão.

Além de apresentar variantes dos genes da V-ATPase, os TCGs orais também apresentaram variantes ($MAF < 0,01$) em vários genes que codificam proteínas da membrana lisossômica, transportadores lisossômicos, hidrolases ácidas lisossômicas (proteases, glicosidases, sulfatases e esfingomielinase), além de genes que codificam proteínas que participam da formação de autofagossomos e da via endocítica. Essas variantes estão listadas na Tabela 5. As 5 amostras wild-type para as variantes em *ATP6AP1* e *ATP6V1A* apresentaram variantes no mínimo em duas amostras cada, nos genes de membrana do lisossomo, *DNAJC13* e *NPC1*, genes de transporte do lisossomo, *ABCA8*, *ABCC6* e *TMEM104*, e no gene que codifica uma glicosidase, *GALC* (Figura 7C). Foram identificadas variantes que ocorreram exclusivamente em ambos os tumores (5A e 5B) do caso bilateral do TCG oral (5A e 5B) em genes que participam da via da endocitose, *AGAP3*, transportadores dos lisossomos *SLC15A3* e *SLC31A2* e do gene que codifica uma protease, *CTSB*. Além disso, a variante p.A326T em *ATG9A*, envolvida na formação autofagossômica, ocorreu no par de amostras de tumores bilaterais, 5A e 5B.

Os TCGs esporádicos orais sequenciados não apresentaram mutações nos genes *PTEN* e *PTPN11* associados a síndromes genéticas e a múltiplos TCGs.

5.2.2 Sequenciamento de Sanger

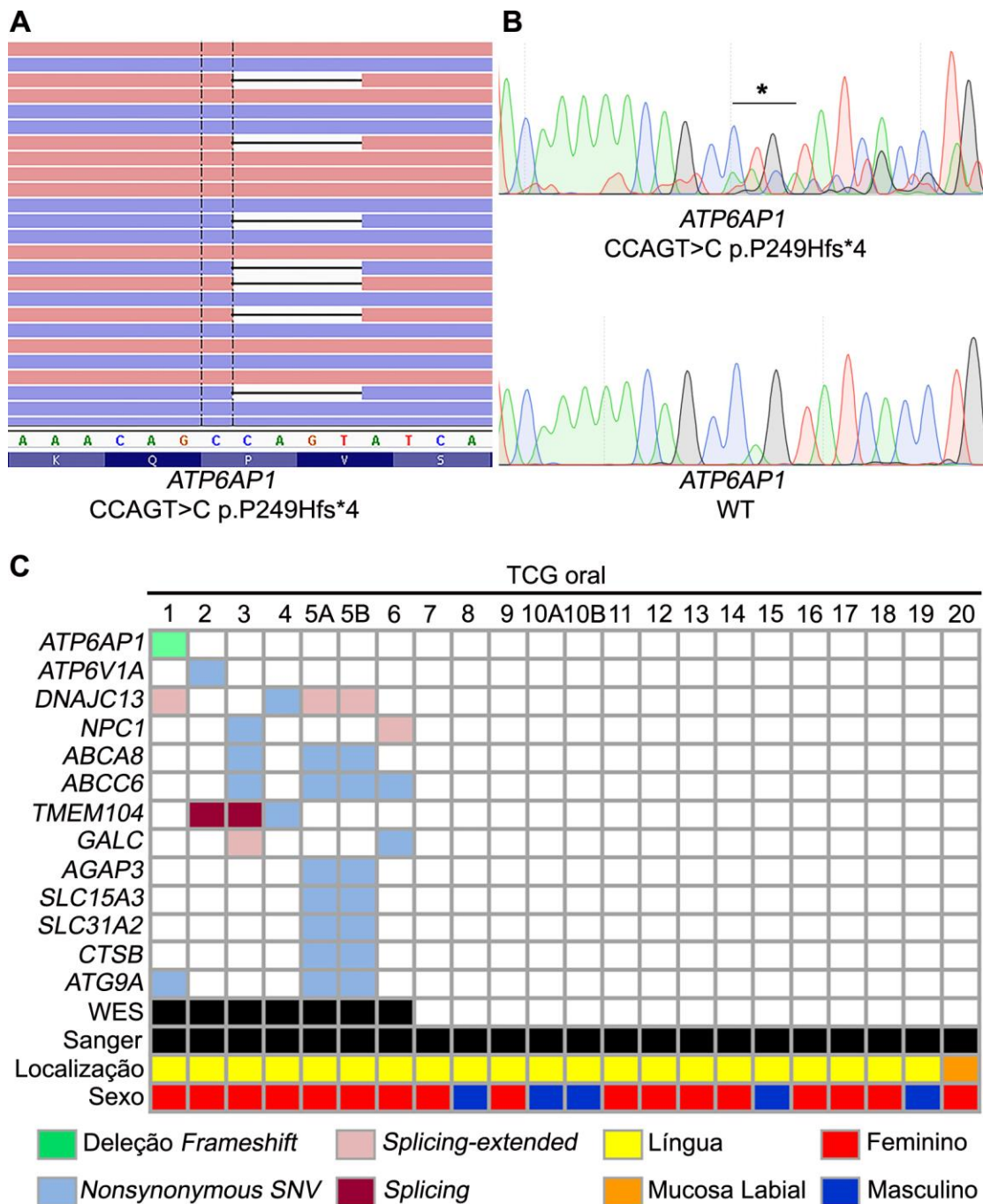
As variantes *ATP6AP1* p.P249Hfs*4 e *ATP6V1A* p.D290N foram investigadas em um conjunto 15 TCGs orais no coorte de expansão, mas não foram detectadas pelo sequenciamento de Sanger em nenhuma dessas amostras. Também foi realizada a validação da variante *ATP6AP1* p.P249Hfs*4 amostra TCG oral 1 (FIGURA 7B). Não foi possível observar, por sequenciamento de Sanger, a variante *ATP6V1A* p.D290N na amostra TCG oral 2, provavelmente devido a baixa frequência alélica ($VAF=20\%$, 2/10 reads) no WES.

Tabela 4 – Dados clínicos dos 22 TCGs orais e informações do sequenciamento das variantes detectadas do complexo V-ATPase

Amostras	Idade (anos)	Sexo	Localização	Sequenciamento	ATP6AP1	ATP6V1A
TCG oral 1	42	F	Língua	WES/ Sanger	<i>ATP6AP1</i> p.P249Hfs*4	WT
TCG oral 2	32	F	Língua	WES/ Sanger	WT	<i>ATP6V1A</i> p.D290N
TCG oral 3	22	F	Língua	WES/Sanger	WT	WT
TCG oral 4	18	F	Língua	WES/Sanger	WT	WT
TCG oral 5A	36	F	Língua	WES/Sanger	WT	WT
TCG oral 5B	36	F	Língua	WES/Sanger	WT	WT
TCG oral 6	40	F	Língua	WES/Sanger	WT	WT
TCG oral 7	47	F	Língua	Sanger	WT	WT
TCG oral 8	48	M	Língua	Sanger	WT	WT
TCG oral 9	28	F	Língua	Sanger	WT	WT
TCG oral 10A	27	M	Língua	Sanger	WT	WT
TCG oral 10B	27	M	Língua	Sanger	WT	WT
TCG oral 11	45	F	Língua	Sanger	WT	WT
TCG oral 12	26	F	Língua	Sanger	WT	WT
TCG oral 13	17	F	Língua	Sanger	WT	WT
TCG oral 14	18	F	Língua	Sanger	WT	WT
TCG oral 15	43	M	Língua	Sanger	WT	WT
TCG oral 16	30	F	Língua	Sanger	WT	WT
TCG oral 17	29	F	Língua	Sanger	WT	WT
TCG oral 18	17	F	Língua	Sanger	WT	WT
TCG oral 19	61	M	Língua	Sanger	WT	WT
TCG oral 20	10	F	Lábio superior	Sanger	WT	WT

TCG: Tumor de células granulares, F: Feminino, M: Masculino, WES: *Whole-Exome Sequencing*, WT: *Wild-Type*.

Figura 7 – Dados clínicos e moleculares dos TCGs orais



A) Captura de tela IGV ilustrando a variante *ATP6AP1* p.P249Hfs*4 detectada no TCG oral 1. **B)** Cromatogramas representativos do sequenciamento Sanger mostrando a mutação *ATP6AP1* deleção *frameshift* no TCG oral 1 e uma amostra wild-type. **C)** Variantes *nonsynonymous SNVs* identificadas nos TCGs orais por sequenciamento completo do exoma (amostras TCGs orais 1-6, n=7). Variantes nos genes do complexo V-ATPase (*ATP6AP1* e *ATP6V1A*) foram detectadas em uma amostra cada uma. O sequenciamento de Sanger foi usado para rastrear essas mutações específicas nas amostras TCGs orais 7-20, todas wild-type. Os genes das vias lisossomos/endossomos/autofagia que apresentaram variantes (MAF <0,01) em pelo menos duas amostras cada, excluindo os casos de V-ATPase mutantes, são mostrados. Os casos são apresentados em colunas e os genes em linhas.

chr17:72786411	<i>nonsynonymous SNV</i>	<i>TMEM104</i>			✓			p.E108K
chr17:72791662	<i>splicing</i>	<i>TMEM104</i>		✓	✓			
chr7:150811876	<i>nonsynonymous SNV</i>	<i>AGAP3</i>				✓	✓	p.Q7K
chr2:220089117	<i>nonsynonymous SNV</i>	<i>ATG9A</i>				✓	✓	p.A326T
chr2:220089141	<i>nonsynonymous SNV</i>	<i>ATG9A</i>	✓					p.E318Q
chr8:11708430	<i>nonsynonymous SNV</i>	<i>CTSB</i>				✓	✓	p.P91L
chr11:60714046	<i>nonsynonymous SNV</i>	<i>SLC15A3</i>				✓	✓	p.L269P
chr9:115923921	<i>nonsynonymous SNV</i>	<i>SLC31A2</i>				✓	✓	p.E69V
chr6:43400500	<i>nonsynonymous SNV</i>	<i>ABCC10</i>			✓			p.R218H
chr10:101605468	<i>nonsynonymous SNV</i>	<i>ABCC2</i>			✓			p.I1359L
chr14:74769606	<i>nonsynonymous SNV</i>	<i>ABCD4</i>					✓	p.A4P
chr14:74759248	<i>splicingextended</i>	<i>ABCD4</i>					✓	
chr20:32878181	<i>stopgain</i>	<i>AHCY</i>			✓			p.W310X
chr22:51063778	<i>nonsynonymous SNV</i>	<i>ARSA</i>					✓	p.N442S
chr11:64679690	<i>nonsynonymous SNV</i>	<i>ATG2A</i>			✓			p.K318N
chr11:64680766	<i>nonsynonymous SNV</i>	<i>ATG2A</i>		✓				p.R233H
chr11:64676761	<i>nonsynonymous SNV</i>	<i>ATG2A</i>		✓				p.R729H
chr7:150712964	<i>splicingextended</i>	<i>ATG9B</i>				✓		
chr16:19620341	<i>nonsynonymous SNV</i>	<i>C16orf62</i>				✓		p.K398N

chr9:136333487	<i>nonsynonymous SNV</i>	CACFD1				✓	p.A110S
chr9:136333472	<i>nonsynonymous SNV</i>	CACFD1				✓	p.E105K
chr9:136333706	<i>nonsynonymous SNV</i>	CACFD1				✓	p.P150L
chr12:53566417	<i>inserção frameshift</i>	CSAD		✓			p.E48fs
chr1:220152884	<i>nonsynonymous SNV</i>	EPRS			✓		p.P1262L
chr5:74016270	<i>nonsynonymous SNV</i>	HEXB		✓			p.Q479K
chr8:98831464	<i>stopgain</i>	LAPTM4B		✓			p.K260X
chr17:40695414	<i>stopgain</i>	NAGLU				✓	p.R464X
chr8:53586578	<i>nonsynonymous SNV</i>	RB1CC1			✓		p.E277Q
chr17:78187993	<i>nonsynonymous SNV</i>	SGSH		✓			p.A214D
chr12:51393007	<i>nonsynonymous SNV</i>	SLC11A2			✓		p.A205T
chr12:51402914	<i>nonsynonymous SNV</i>	SLC11A2	✓				p.T3M
chr17:78210868	<i>nonsynonymous SNV</i>	SLC26A11		✓			p.A293G
chr9:130167132	<i>nonsynonymous SNV</i>	SLC2A8			✓		p.A175T
chr13:29287326	<i>nonsynonymous SNV</i>	SLC46A3		✓			p.G184V
chr3:133664015	<i>nonsynonymous SNV</i>	SLCO2A1				✓	p.N462S
chr4:983556	<i>nonsynonymous SNV</i>	SLC26A1			✓		p.H391Y
chrX:135067686	<i>nonsynonymous SNV</i>	SLC9A6				✓	p.A9S
chr11:6413196	<i>nonsynonymous SNV</i>	SMPD1			✓		p.V301I

chr11:6413014	nonsynonymous SNV	SMPD1			✓		p.R240Q
chr17:66432518	splicingextended	WIP11			✓		
chr16:88884478	nonsynonymous SNV	GALNS		✓			p.Q288H
chr16:88923279	nonsynonymous SNV	GALNS		✓			p.A3T
chr19:3110203	nonsynonymous SNV	GNA11		✓			p.A65T
chr13:77459394	nonsynonymous SNV	KCTD12		✓			p.T297M
chr13:113973786	nonsynonymous SNV	LAMP1		✓			p.T189S
chr6:74348195	nonsynonymous SNV	SLC17A5		✓			p.M185V
chr5:54960623	nonsynonymous SNV	SLC38A9	✓				p.W136G
chr11:74876974	nonsynonymous SNV	SLCO2B1	✓				p.R121L
chr12:132403794	nonsynonymous SNV	ULK1		✓			p.T850M

Foram listadas apenas as variantes com MAF<0.01 (do inglês *Minor Allele Frequency*, MAF) nos seguintes bancos de dados: *1000 genomes* - <http://www.1000genomes.org/>, *Exome Aggregation Consortium* (ExAC) - <http://exac.broadinstitute.org/> e *The Genome Aggregation Database* (gnomAD) - <https://gnomad.broadinstitute.org/>.

6 DISCUSSÃO

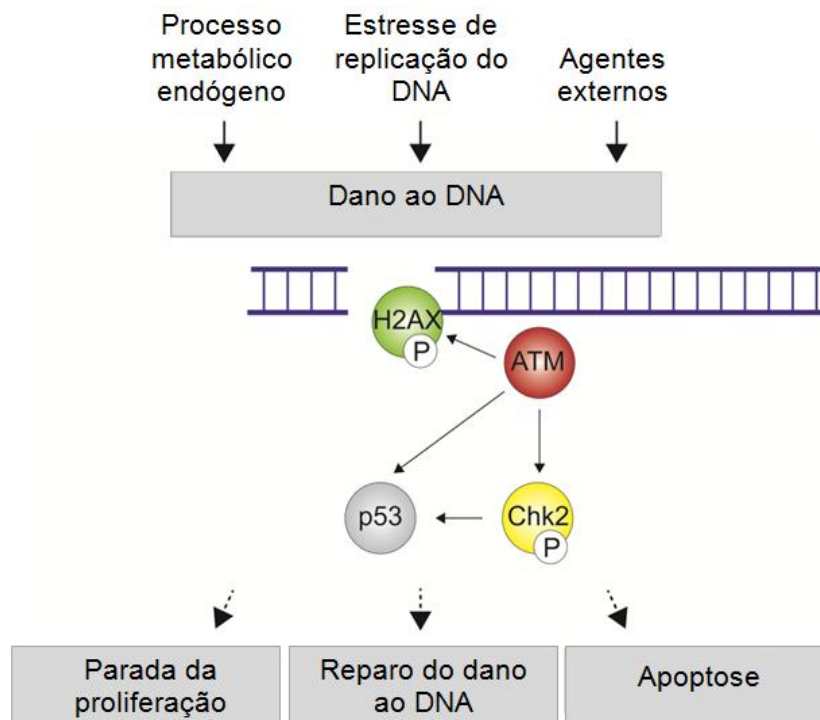
Apesar de a cavidade oral ser um dos locais mais afetados pelos TCGs, poucos estudos de patologia molecular incluíram amostras de TCGs orais (GOMES, FONSECA-SILVA; GOMEZ, 2013; PAREJA *et al.*, 2018). Sendo assim, foi realizada uma caracterização genética de TCGs orais combinando NGS alvo específico para um painel de 50 genes em uma primeira etapa do estudo e, na ausência de mutações patogênicas recorrentes, em uma segunda etapa realizou-se WES.

As análises desse pequeno conjunto de amostra de TCGs orais por NGS com um painel pré-definido de genes resultaram na identificação de mutações possivelmente patogênicas não reportadas nestes tumores anteriormente. Foram identificadas três variantes missense: *KDR* (p.Asp257Asn), *ATM* (p.Ala2883Val) e *SMO* (p.Glu224Asp) que, de acordo com predições *in silico*, poderiam ser deletérias.

O método NGS utilizado na primeira etapa deste estudo foi desenhado para avaliar variantes de baixa frequência que frequentemente ocorrem em tecidos neoplásicos devido à heterogeneidade tumoral. As mutações em *KDR* e *ATM* foram variantes de baixa frequência (<10%), que foram detectadas por esta técnica altamente sensível. Devido a essas baixas frequências, elas não puderam ser validadas por outros métodos, como o sequenciamento de Sanger (JENNINGS *et al.*, 2017). A variante *SMO* rs148484943 mostrou uma frequência alélica (VAF) de 51%, consistente com um *SNP* heterozigótico. De acordo com o banco de dados dbSNP, o alelo T pode ser germinativo, apesar de mostrar uma frequência muito baixa na população. De acordo com o *PolyPhen2*, este SNV tem um efeito possivelmente deletério, no entanto, tem um efeito tolerado considerando os escores do *SIFT*. Em vista do mencionado acima e do fato de que o significado clínico deste SNV é desconhecido, não validamos essa variante por métodos ortogonais. A variante *ATM* foi a única prevista como tendo efeitos deletérios ao nível da proteína, tanto pelo *SIFT* quanto pelo *PolyPhen2*. A amostra TCG oral 1 mostrou além da variante em *ATM* outras variantes *missense*: *KDR* (p.Asp257Asn), predita de ter efeito deletério e *GNAQ* (p.Val240Met), benigna de acordo com análises *in silico*. Uma possível explicação para a presença simultânea de mais de uma variante é que a ocorrência do SNV *missense* no gene *ATM* facilitaria o surgimento de outras mutações. *ATM* é uma proteína-quinase grande, que desempenha um papel crucial na via de resposta a danos no DNA. Quando ocorrem quebras de DNA de fitas

duplas, *ATM* desencadeia uma cascata de sinalização recrutando outras proteínas envolvidas no reconhecimento e reparo de danos no DNA, checkpoints do ciclo celular, regulação transcricional e apoptose (ZHOU; ELLEDGE, 2000). A inativação da *ATM* e a consequente sinalização defeituosa de reparo do DNA podem levar ao acúmulo de danos no DNA e ao surgimento de mutações, aumentando o risco de desenvolvimento de neoplasias (BURMA et al., 2001; FAN et al., 2006; SHILOH, 2003). Curiosamente, nossos achados de IHQ estão de acordo com essa ideia, uma vez que a amostra com a variante em *ATM* mostrou a menor imunomarcação dos marcadores de sinalização de dano ao DNA pChk2 e γ H2AX quando comparada às demais amostras, sendo a expressão de ambas ativadas pelo *ATM* (FIGURA 8).

Figura 8 – Resposta do dano ao DNA mediada por *ATM*



Danos no DNA podem ser causados por agentes endógenos e/ou exógenos e promovem respostas celulares apropriadas que podem ser paradas permanentes da progressão do ciclo celular, reparo do DNA e apoptose. *ATM* é uma proteína que funciona com um sensor ao dano do DNA iniciando cascatas de transdução de sinal e fosforilando Chk2. A Histona H2A.X também é substrato da *ATM* e sua fosforilação ocorre em resposta a quebras na fita dupla do DNA. A mutação *ATM* leva a falhas na detecção e reparo de danos no DNA e a um acúmulo de danos, o que, por sua vez, leva a mutações.

Como *ATM* (p.Ala2883Val) ocorreu em apenas uma das seis amostras, o papel de tal SNV na patogênese do TCG oral, se houver, parece ser pontual.

As V-ATPases são complexos enzimáticos com várias subunidades, com a função de acidificar os compartimentos intracelulares e transportar prótons através da membrana plasmática (FORGAC, 2007). Notavelmente, as funções da maioria das enzimas lisossômicas requerem um lúmen ácido, que é mantido pelas bombas de prótons da V-ATPase (MELLMAN, 1989).

Mutações em *ATP6AP1* foram previamente relatadas em um caso maligno de TCG (WEI et al., 2015). Recentemente, mutações de *ATP6AP1* e *ATP6AP2* foram reportadas em 63% e 9%, respectivamente, dos TCGs que afetam diferentes tipos de tecidos (PAREJA et al., 2018). As mutações *ATP6AP1*, especificamente p.X324_splice e p.A135Pfs*10, foram detectadas em 1/5 amostra de TCG oral cada, e *ATP6AP2* p.D107Vfs*29 em 1/5 (PAREJA et al., 2018). O silenciamento de *ATP6AP1* e *ATP6AP2* nas células HEK293 e MCF-10A e a depleção de *ATP6AP1* e *ATP6AP2* em células de Schwann resultaram no acúmulo de estruturas intracitoplasmáticas semelhantes às observadas nos TCGs humanos (PAREJA et al., 2018). Esses autores observaram diminuição da acidificação endossômica após silenciamento de *ATP6AP1* e *ATP6AP2* e, usando um ensaio de atividade da V-ATPase, mostraram que esse silenciamento resultou em atividade reduzida da V-ATPase em comparação com o controle. Considerando que os lisossomos são compartimentos endossômicos ácidos, eles testaram ainda os efeitos do silenciamento transitório de *ATP6AP1* ou *ATP6AP2* na atividade lisossômica e mostraram atividade lisossômica diminuída nesse cenário (PAREJA et al., 2018). Coletivamente, os resultados *in vitro* indicam que a perda de *ATP6AP1* e *ATP6AP2* resulta em diminuição da função da V-ATPase com subsequente diminuição da atividade lisossômica (PAREJA et al., 2018).

Mutações recorrentes nos genes da V-ATPase foram relatadas em 28/51 TCGs cutâneos e mucosos, nenhum deles localizado na cavidade oral (SEKIMIZU et al., 2019). Especificamente, essas mutações ocorreram em *ATP6AP1* (23/51), *ATP6AP2* (2/51) e *ATP6V0C* (3/51) (SEKIMIZU et al., 2019). Notavelmente, nenhuma variante recorrente foi detectada nos dois coorte de TCGs (PAREJA et al., 2018; SEKIMIZU et al., 2019).

Em nosso conjunto amostral, composto por 21 TCGs orais na língua e um na mucosa labial, foram detectadas variantes em *ATP6AP1* e *ATP6V1A* em um

caso, cada. Nenhuma variante *ATP6AP2* foi identificada por WES em nossas amostras, de acordo com a baixa proporção de TCGs que anteriormente apresentaram variantes nesse gene (PAREJA et al., 2018; SEKIMIZU et al., 2019). As variantes *frameshift* no *ATP6AP1* (p.P249Hfs*4) e *nonsynonymous* no *ATP6AV1A* (p.D290N) são novas não relatadas anteriormente. A V-ATPase é o principal fator de acidificação na via endocítica/lisossômica e várias doenças são causadas por distúrbios na acidificação organelar (MINDELL, 2012). No entanto, mímicis histológicas dos TCGs, incluindo schwannomas, paragangliomas, entre outros, foram previamente rastreadas quanto às mutações *ATP6AP1* e *ATP6AP2* e todas foram negativas, sugerindo que essas mutações sejam patognomônicas dos TCGs (PAREJA et al., 2018). Além disso, mutações em *ATP6AP1* parecem afetar não apenas os casos benignos de TCGs, como também casos malignos. Das seis amostras malignas utilizadas por Pareja *et al.*, (2018), cinco apresentaram mutações no gene *ATP6AP1*. A única amostra maligna incluída no estudo de Sekimizu *et al.*, (2019) teve mutação no gene *ATP6AP1*.

Notavelmente, nossas descobertas adicionam novas mutações da V-ATPase ao espectro de alterações genéticas dos TCGs. Além disso, nossos resultados sugerem que os TCGs orais compartilham a mesma patogênese molecular que os TCGs que ocorrem em tecidos moles extra-orais, trato gastrointestinal e pele. Tal descoberta é realmente interessante, pois aparentemente a patogênese dos TCGs parece ser mais dependente da célula de origem do que do tipo de tecido, isto é, TCGs de diferentes tecidos/órgãos parecem ter a mesma base genética.

Os TCGs são caracterizados pela presença de grânulos intracitoplasmáticos que correspondem a lisossomos, e estudos ultra-estruturais sugerem que esses grânulos sejam autofagossomos resultantes da mielina fagocitada por lisossomos (BEDETTI et al., 1983; FISHER; WECHSLER, 1962; KURTIN; BONIN, 1994; SHINTAKU, 2011). Portanto, filtramos genes envolvidos em tais processos nas amostras wild-type para as variantes V-ATPase (*ATP6AP1* e *ATP6AV1A*). Identificamos variantes em outros componentes da via lisossômica, incluindo proteínas transportadoras e membranas lisossômicas, hidrolases ácidas lisossômicas e formação de autofagossomo. Variantes em seis desses genes ocorreram em pelo menos duas amostras wild-type "V-ATPase", incluindo genes que codificam proteínas transportadoras lisossômicas, *ABCA8*, *ABCC6*, *TMEM104*,

DNAJC13 e proteínas da membrana lisossômica, *NPC1*, e glicosidase, *GALC*. Além disso, variantes em 5 genes afetaram apenas o par de amostras dos tumores bilaterais (caso 5), ocorrendo no gene da via endocítica *AGAP3*, nos transportadores do lisossomo *SLC15A3* e *SLC31A2*, no gene da protease *CTSB* e na proteína ATG envolvida no mecanismo principal do autofagossomo em *ATG9A* (BISSA; BEEDLE; GOVINDARAJAN, 2016; FENG et al., 2014; MIZUSHIMA; YOSHIMORI; OHSUMI, 2011; SCHRÖDER et al., 2010; SZTUL et al., 2019).

Estudos ultraestruturais sugerem que, nos TCGs, as células de Schwann acumulam lisossomos/autofagossomos com mielina, e os nossos resultados e de outros grupos (PAREJA et al., 2018; SEKIMIZU et al., 2019) apontam para uma função endossômica/lisossômica defeituosa nesses tumores. Esses achados morfológicos e genéticos acrescentam mais informações à caracterização da patologia molecular dessas lesões. No entanto, ainda existem algumas lacunas que precisam ser preenchidas para alcançar a elucidação completa da patogênese dos TCGs.

Os mecanismos de formação de TCG ainda não são claros. Os lisossomos são considerados o "ponto final" da via endocítica, e várias enzimas lisossômicas participam da degradação e reciclagem de componentes extracelulares e intracelulares, por meio de endocitose e autofagia (WANG et al., 2017). A maioria das alterações patológicas dos nervos envolve a quebra da bainha de mielina e a digestão de mielina nos nervos lesionados é realizada pelas células de Schwann. Foi demonstrado que a lesão do nervo periférico faz com que as células de Schwann degradem a mielina pela autofagia, com restos de mielina encontrados nos autofagossomos (GOMEZ-SANCHEZ et al., 2015). Um processo semelhante poderia estar envolvido no início dos TCGs? O que desencadeia a acumulação lisossômica em tais tumores? Além disso, uma análise proteômica dos lisossomos acumulados nos TCGs poderia revelar mais pistas sobre sua patogênese? Essas são perguntas que ainda não tem respostas e que poderão ser respondidas por estudos futuros.

7 CONCLUSÃO

Foram reportadas novas variantes nos genes das proteínas acessórias do complexo V-ATPase e V-ATPase. Além disso, amostras que não continham variantes da V-ATPase mostraram a presença de variantes em genes que codificam proteínas envolvidas na função lisossômica ou na formação do autofagossomo. Coletivamente, nossos resultados sugerem que os TCGs de diferentes tecidos/órgãos têm uma patogênese molecular semelhante e mostram que variantes nos genes lisossômicos/endossômicos/autofagossômicos desempenham uma função crucial na patogênese dos TCGs orais.

REFERÊNCIAS

- ABRIKOSOFF, A. Über Myome. **Virchows Archiv für Pathologische Anatomie und Physiologie und für Klinische Medizin**, v. 260, n. 1, p. 215–233, mar. 1926.
- ABRIKOSOFF, A. I. Weitere Untersuchungen über Myoblastenmyome. **Virchows Archiv für Pathologische Anatomie und Physiologie und für Klinische Medizin**, v. 280, n. 3, p. 723–740, abr. 1931.
- ALLEN, C. M.; GNEPP, D. R.; RO, C. J. Granular cell tumor. In: EL-NAGGAR, A. et al. (Eds.). **World Health Organization classification of head and neck tumours**. 4th. ed. Lyon: IARC, 2017. p. 121–122.
- ALOTAIBY, F. M. et al. Demographic, Clinical and Histopathological Features of Oral Neural Neoplasms: A Retrospective Study. **Head and Neck Pathology**, v. 13, n. 2, p. 208–214, 21 jun. 2019.
- ALTSHULER, D. L. et al. A map of human genome variation from population-scale sequencing. **Nature**, v. 467, n. 7319, p. 1061–1073, 27 out. 2010.
- BAMPS, S. et al. Multiple granular cell tumors in a child with Noonan syndrome. **European journal of pediatric surgery : official journal of Austrian Association of Pediatric Surgery ... [et al] = Zeitschrift fur Kinderchirurgie**, v. 23, n. 3, p. 257–9, 22 jun. 2013.
- BECELLI, R. et al. Abrikossoff's Tumor. **Journal of Craniofacial Surgery**, v. 12, n. 1, p. 78–81, jan. 2001.
- BEDETTI, C. D. et al. Granular cell tumor arising in myelinated peripheral nerves. **Virchows Archiv A Pathological Anatomy and Histopathology**, v. 402, n. 2, p. 175–183, 1983.
- BILLERET LEBRANCHU, V. [Granular cell tumor. Epidemiology of 263 cases]. **Archives d'anatomie et de cytologie pathologiques**, v. 47, n. 1, p. 26–30, 1999.
- BISSA, B.; BEEDLE, A.; GOVINDARAJAN, R. Lysosomal solute carrier transporters gain momentum in research. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 100, n. 5, p. 431–436, nov. 2016.
- BONAM, S. R.; WANG, F.; MULLER, S. Lysosomes as a therapeutic target. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 18, n. 12, p. 923–948, 2 dez. 2019.
- BULEY, I. D. et al. Granular cell tumours revisited. An immunohistological and ultrastructural study. **Histopathology**, v. 12, n. 3, p. 263–274, mar. 1988.
- BURMA, S. et al. ATM Phosphorylates Histone H2AX in Response to DNA Double-strand Breaks. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 45, p. 42462–42467, 2001.

CHAPEL, A. et al. An Extended Proteome Map of the Lysosomal Membrane Reveals Novel Potential Transporters. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 12, n. 6, p. 1572–1588, jun. 2013.

CHOI, S. M. et al. A Case of Malignant Granular Cell Tumor in the Sigmoid Colon. **Clinical Endoscopy**, v. 47, n. 2, p. 197, 2014.

CHRYSOMALI, E. et al. Benign neural tumors of the oral cavity. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 84, n. 4, p. 381–390, out. 1997.

CIPRIANO, D. J. et al. Structure and regulation of the vacuolar ATPases. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1777, n. 7–8, p. 599–604, 2008.

COTTER, K. et al. Recent Insights into the Structure, Regulation, and Function of the V-ATPases. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 40, n. 10, p. 611–622, 2015.

EGUIA, A. et al. Granular cell tumor: report of 8 intraoral cases. **Medicina oral, patología oral y cirugía bucal**, v. 11, n. 5, p. E425-8, 1 ago. 2006.

FAN, C. et al. ATM activation is accompanied with earlier stages of prostate tumorigenesis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1763, n. 10, p. 1090–1097, out. 2006.

FANBURG-SMITH, J. C. et al. Malignant Granular Cell Tumor of Soft Tissue. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 22, n. 7, p. 779–794, jul. 1998.

FENG, Y. et al. The machinery of macroautophagy. **Cell Research**, v. 24, n. 1, p. 24–41, 24 jan. 2014.

FISHER, E. R.; WECHSLER, H. Granular cell myoblastoma—a misnomer. Electron microscopic and histochemical evidence concerning its schwann cell derivation and nature (granular cell schwannoma). **Cancer**, v. 15, n. 5, p. 936–954, set. 1962.

FLETCHER, C. D. M. Nerve sheath tumors: Granular cell tumors. In: FLETCHER CDM, BRIDGE JA, HOGENDOORN PCW, M. F. (Ed.). . **WHO Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone**. 4th. ed. Lyon: IARC Press, 2013. p. 178.

FORGAC, M. Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 11, p. 917–929, nov. 2007.

FRANÇA, J. A. et al. Sporadic granular cell tumours lack recurrent mutations in PTPN11, PTEN and other cancer-related genes. **Journal of clinical pathology**, v. 71, n. 1, p. 93–94, jan. 2018.

FRANCO, T. et al. Oral peripheral nerve sheath tumors: A clinicopathological and immunohistochemical study of 32 cases in a Brazilian population. **Journal of Clinical and Experimental Dentistry**, v. 9, n. 12, p. e1459–e1465, 2017.

GARRISON, E.; MARTH, G. Haplotype-based variant detection from short-read sequencing. p. 1–9, 17 jul. 2012.

GOMES, C. C.; FONSECA-SILVA, T.; GOMEZ, R. S. Evidence for loss of heterozygosity (LOH) at chromosomes 9p and 17p in oral granular cell tumors: a pilot study. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology**, v. 115, n. 2, p. 249–53, fev. 2013.

GOMEZ-SANCHEZ, J. A. et al. Schwann cell autophagy, myelinophagy, initiates myelin clearance from injured nerves. **The Journal of cell biology**, v. 210, n. 1, p. 153–68, 6 jul. 2015.

GURZU, S. et al. The immunohistochemical profile of granular cell (Abrikossoff) tumor suggests an endomesenchymal origin. **Archives of Dermatological Research**, v. 307, n. 2, p. 151–157, 28 mar. 2015.

HOLLIDAY, L. S. Vacuolar H⁺-ATPases (V-ATPases) as therapeutic targets: a brief review and recent developments. **Biotarget**, v. 1, n. 7, p. 18–18, 2017.

INPANATHAN, S.; BOTELHO, R. J. The Lysosome Signaling Platform: Adapting With the Times. **Frontiers in cell and developmental biology**, v. 7, n. JUN, p. 113, 20 jun. 2019.

JENNINGS, L. J. et al. Guidelines for Validation of Next-Generation Sequencing-Based Oncology Panels: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology and College of American Pathologists. **The Journal of molecular diagnostics : JMD**, v. 19, n. 3, p. 341–365, 2017.

JOBRAK, A. D.; GOEL, S.; COTLAR, A. M. Granular Cell Tumor: Report of 13 Cases in a Veterans Administration Hospital. **Military medicine**, v. 183, n. 9–10, p. e589–e593, 1 set. 2018.

KAISERLING, E.; RUCK, P.; XIAO, J.-C. Congenital epulis and granular cell tumor. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 80, n. 6, p. 687–697, dez. 1995.

KURTIN, P. J.; BONIN, D. M. Immunohistochemical demonstration of the lysosome-associated glycoprotein CD68 (KP-1) in granular cell tumors and schwannomas. **Human Pathology**, v. 25, n. 11, p. 1172–1178, nov. 1994.

LACK, E. E. et al. Granular cell tumor: A clinicopathologic study of 110 patients. **Journal of Surgical Oncology**, v. 13, n. 4, p. 301–316, abr. 1980.

LI, H. et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. **Bioinformatics**, v. 25, n. 16, p. 2078–2079, 15 ago. 2009.

LI, H.; DURBIN, R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. **Bioinformatics**, v. 25, n. 14, p. 1754–1760, 15 jul. 2009.

LUZIO, J. P.; PRYOR, P. R.; BRIGHT, N. A. Lysosomes: fusion and function. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 8, p. 622–632, ago. 2007.

MACHADO, I. et al. Solitary, multiple, benign, atypical, or malignant: the “Granular Cell Tumor” puzzle. **Virchows Archiv**, v. 468, n. 5, p. 527–538, 5 maio 2016.

MARCHESE, C. et al. Granular cell tumor in a PHTS patient with a novel germlinePTEN mutation. **American Journal of Medical Genetics**, v. 120A, n. 2, p. 286–288, 15 jul. 2003.

MARINO-ENRIQUEZ, A.; FLETCHER, C. D. M. Shouldn't we care about the biology of benign tumours? **Nature Reviews Cancer**, v. 14, n. 11, p. 701–702, 16 nov. 2014.

MARTIN, R. W. 3RD. et al. Multiple cutaneous granular cell tumors and neurofibromatosis in childhood. A case report and review of the literature. **Archives of dermatology**, v. 126, n. 8, p. 1051–6, 1 ago. 1990.

MCGUIRE, C. et al. Regulation of V-ATPase assembly and function of V-ATPases in tumor cell invasiveness. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 1857, n. 8, p. 1213–1218, ago. 2016.

MCKENNA, A. et al. The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. **Genome Research**, v. 20, n. 9, p. 1297–1303, 1 set. 2010.

MELLMAN, I. Organelles Observed: Lysosomes. **Science**, v. 244, n. 4906, p. 853–854, 19 maio 1989.

MINDELL, J. A. Lysosomal Acidification Mechanisms. **Annual Review of Physiology**, v. 74, n. 1, p. 69–86, 17 mar. 2012.

MITTAL, K. R.; TRUE, L. D. Origin of granules in granular cell tumor. Intracellular myelin formation with autodigestion. **Archives of pathology & laboratory medicine**, v. 112, n. 3, p. 302–3, mar. 1988.

MIZUSHIMA, N.; YOSHIMORI, T.; OHSUMI, Y. The role of Atg proteins in autophagosome formation. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 27, n. 1, p. 107–32, 10 nov. 2011.

MOBARKI, M. et al. Granular cell tumor a study of 42 cases and systemic review of the literature. **Pathology - Research and Practice**, v. 216, n. 4, p. 152865, abr. 2020.

MOTEN, A. S. et al. Granular cell tumor experience at a comprehensive cancer center. **Journal of Surgical Research**, v. 226, p. 1–7, jun. 2018.

MUKAI, M. Immunohistochemical localization of S-100 protein and peripheral nerve myelin proteins (P2 protein, P1 protein) in granular cell tumors. **American Journal of Pathology**, v. 112, n. 2, p. 139–146, 1983.

NEVILLE, B. W. et al. Tumores dos Tecidos Moles: Tumor de Células Granulares. In: **Patologia oral & maxilofacial**. 3rd. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. p. 538–539.

ORDÓÑEZ, N. G. Granular cell tumor: a review and update. **Advances in anatomic pathology**, v. 6, n. 4, p. 186–203, jul. 1999.

ORDÓÑEZ, N. G.; MACKAY, B. Granular cell tumor: a review of the pathology and histogenesis. **Ultrastructural pathology**, v. 23, n. 4, p. 207–22, 10 jan. 1999.

PAREJA, F. et al. Loss-of-function mutations in ATP6AP1 and ATP6AP2 in granular cell tumors. **Nature communications**, v. 9, n. 1, p. 3533, 30 dez. 2018.

PARK, S. H.; LEE, S.-H. Noonan syndrome with multiple lentigines with PTPN11 (T468M) gene mutation accompanied with solitary granular cell tumor. **The Journal of Dermatology**, v. 44, n. 11, p. e280–e281, nov. 2017.

RAMASWAMY, P. V. et al. Multiple Granular Cell Tumors in a Child with Noonan Syndrome. **Pediatric Dermatology**, v. 27, n. 2, p. 209–211, mar. 2010.

RICKERT, C. H.; PAULUS, W. Genetic characterisation of granular cell tumours. **Acta Neuropathologica**, v. 103, n. 4, p. 309–312, 2002.

ROBERTS, A. E. et al. Noonan syndrome. **The Lancet**, v. 381, n. 9863, p. 333–342, jan. 2013.

SCHRADER, K. et al. Multiple granular cell tumors are an associated feature of LEOPARD syndrome caused by mutation in PTPN11. **Clinical Genetics**, v. 75, n. 2, p. 185–189, fev. 2009.

SCHRÖDER, B. A. et al. The proteome of lysosomes. **PROTEOMICS**, v. 10, n. 22, p. 4053–4076, nov. 2010.

SCHWAKE, M.; SCHRÖDER, B.; SAFTIG, P. Lysosomal Membrane Proteins and Their Central Role in Physiology. **Traffic**, v. 14, n. 7, p. 739–748, jul. 2013.

SEKIMIZU, M. et al. Frequent mutations of genes encoding vacuolar H⁺ - ATPase components in granular cell tumors. **Genes, Chromosomes and Cancer**, v. 58, n. 6, p. 373–380, 21 jun. 2019.

SENA COSTA, N. C. et al. Granular cell tumor presenting as a tongue nodule: two case reports. **Journal of Medical Case Reports**, v. 6, n. 1, p. 56, 10 dez. 2012.

SHILOH, Y. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 3, p. 155–168, mar. 2003.

SHINTAKU, M. Immunohistochemical localization of autophagosomal membrane-associated protein LC3 in granular cell tumor and schwannoma. **Virchows Archiv**, v. 459, n. 3, p. 315–319, 15 set. 2011.

SPEIGHT, P. M. Granular cell tumour. In: BARNES, L. et al. (Eds.). . **World Health**

Organization Classification of Tumours. Pathology and genetics of Head and neck tumours. Lyon: IARC Press, 2005. p. 185–186.

STEWART, C. M. et al. Oral granular cell tumors: A clinicopathologic and immunocytochemical study. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology**, v. 65, n. 4, p. 427–435, abr. 1988.

SZTUL, E. et al. ARF GTPases and their GEFs and GAPs: concepts and challenges. **Molecular Biology of the Cell**, v. 30, n. 11, p. 1249–1271, 15 maio 2019.

TOBOUTI, P. et al. Extra-tongue oral granular cell tumor: Histological and immunohistochemical aspect. **Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal**, v. 22, n. 1, p. e31–e35, 1 jan. 2017.

TOMSON, N.; ABDULLAH, A.; TAN, C. Y. Multiple granular cell tumors in a child with growth retardation. Report of a case and review of the literature. **International Journal of Dermatology**, v. 45, n. 11, p. 1358–1361, nov. 2006.

TORRIJOS-AGUILAR, A. et al. [Cutaneous granular cell tumor: a clinical and pathologic analysis of 34 cases]. **Actas dermo-sifilograficas**, v. 100, n. 2, p. 126–32, mar. 2009.

VAN DE LOO, S. et al. Granular cell tumor of the oral cavity; a case series including a case of metachronous occurrence in the tongue and the lung. **Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal**, v. 20, n. 1, p. e30–e33, 2015.

VERED, M.; CARPENTER, W. M.; BUCHNER, A. Granular cell tumor of the oral cavity: updated immunohistochemical profile. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 38, n. 1, p. 150–159, 23 dez. 2008.

VIRCHOW, R. Ueber Makroglossie und pathologische Neubildung quergestreifter Muskelfasern. **Archiv für Pathologische Anatomie und Physiologie und für Klinische Medicin**, v. 7, n. 1, p. 126–138, 1854.

WANG, C. et al. Investigation of endosome and lysosome biology by ultra pH-sensitive nanoprobe. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 113, p. 87–96, abr. 2017.

WANG, K.; LI, M.; HAKONARSON, H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. 16, p. e164–e164, 1 set. 2010.

WEBER, C. O.; VIRCHOW, R. Anatomische Untersuchung einer hypertrophischen Zunge nebst Bemerkungen über die Neubildung quergestreifter Muskelfasern. **Archiv für Pathologische Anatomie und Physiologie und für Klinische Medicin**, v. 7, n. 1, p. 115–125, mar. 1854.

WEI, L. et al. Whole-genome sequencing of a malignant granular cell tumor with metabolic response to pazopanib. **Cold Spring Harbor molecular case studies**, v. 1, n. 1, p. a000380, 24 out. 2015.

WHITTON, B. et al. Vacuolar ATPase as a potential therapeutic target and mediator of treatment resistance in cancer. **Cancer Medicine**, v. 7, n. 8, p. 3800–3811, 2018.

WILLIAMS, H. K.; WILLIAMS, D. M. Oral granular cell tumours: A histological and immunocytochemical study. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 26, n. 4, p. 164–169, 1997.

YOGESH, T. L.; SOWMYA, S. V. Granules in Granular Cell Lesions of the Head and Neck: A Review. **ISRN Pathology**, v. 2011, n. 1, p. 1–10, 2011.

ZHANG, X. et al. Targeting Heat Shock Protein 70 to Ameliorate c-Jun Expression and Improve Demyelinating Neuropathy. **ACS chemical neuroscience**, v. 9, n. 2, p. 381–390, 21 fev. 2018.

ZHOU, B. S.; ELLEDGE, S. J. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. **Nature**, v. 408, n. 6811, p. 433–439, nov. 2000.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Artigo científico I

CORRESPONDENCE

Sporadic granular cell tumours lack recurrent mutations in *PTPN11*, *PTEN* and other cancer-related genes

Granular cell tumour (GCT) is a benign nerve sheath neoplasm of unknown molecular pathogenesis. Although a skeletal muscle cell origin was initially proposed for GCT, its neural origin, derived from Schwann cells, is supported by S-100 immunopositivity.⁴ There are few molecular studies on oral GCT.⁵ GCTs have

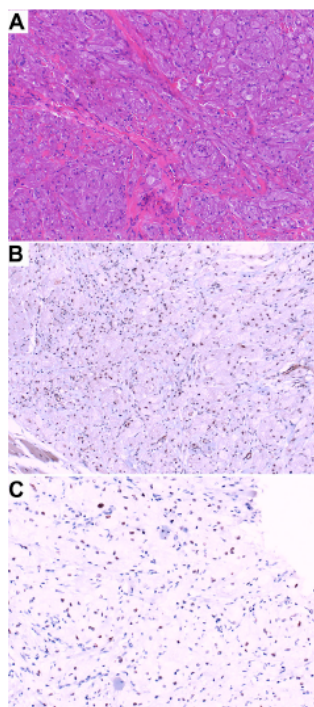


Figure 1 Granular cell tumour (GCT) histopathology and immunohistochemical results. (A) Sheets and small nests of polygonal cells with indistinct border exhibiting granular eosinophilic cytoplasm are observed (H&E, original magnification X10). Decreased immunohistochemical expression of: (B) anti-phospho-Chk2-Thr68 (clone C13C1) and (C) anti-phospho-histone H2A.X-Ser139 (clone 20E3) was observed in sample no. 1, which exhibited the presence of an *ATM* missense mutation (original magnification X40).

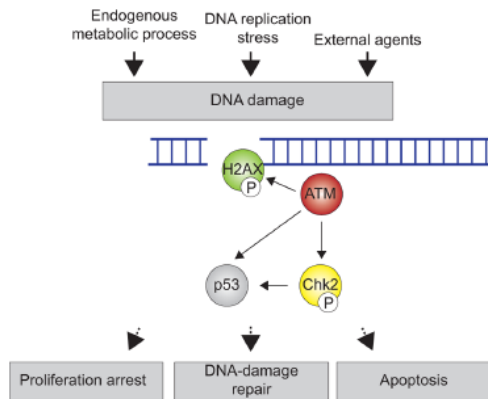


Figure 2 ATM-mediated DNA damage response. DNA damage might be caused by endogenous and/or exogenous agents and promotes cellular responses that can arrest cell cycle progression, DNA repair and apoptosis. ATM is a damage sensor protein that initiates signal transduction cascades and phosphorylates Chk2. The histone H2A.X is also an ATM substrate and its phosphorylation occurs in response to DNA double-strand breaks. *ATM* mutation leads to failures in the DNA damage detection and repair, which in turn result in mutation accumulation.

been previously described in patients with LEOPARD and Noonan syndrome with *PTPN11* gene mutations,³⁻⁶ as well as in a patient with *PTEN* hamartoma tumour syndrome with *PTEN* mutation.⁷ Therefore, we hypothesised that mutations in these genes could be drivers of sporadic GCT pathogenesis.

A convenience sample of six formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) sporadic oral GCT was selected from the archives of the author's institution. All samples were located at the tongue and occurred in female subjects ranging from 18 to 42 years old (median age 34 years old). The H&E stained slides were analysed by two pathologists (CCG and RSG) to confirm the diagnosis (figure 1A). Tumour-enriched areas were ensured by microdissection and DNA was isolated using QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen, USA) and quantified by Qubit 3.0 Fluorometer (Life Technologies, USA) before next-generation sequencing (NGS) library preparation. NGS was performed using the Ion AmpliSeq Cancer Hotspot Panel v2 (Life Technologies). The panel consists of 207 amplicons which cover 2856 COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) mutations in 50 oncogenes and tumour suppressor genes frequently mutated in cancer: *ABLI*, *AKT1*, *ALK*, *APC*, *ATM*, *BRAF*, *CDH1*, *CDKN2A*, *CSF1R*, *CTNNB1*, *EGFR*, *ERBB2*, *ERBB4*, *EZH2*, *FBXW7*, *FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3*, *FLT3*, *GNA11*, *GNAS*, *GNAQ*, *HNF1A*, *HRAS*, *IDH1*, *JAK2*,

JAK3, *IDH2*, *KDR*, *KIT*, *KRAS*, *MET*, *MLH1*, *MPL*, *NOTCH1*, *NPM1*, *NRAS*, *PDGFRA*, *PIK3CA*, *PTEN*, *PTPN11*, *RB1*, *RET*, *SMAD4*, *SMARCB1*, *SMO*, *SRC*, *STK11*, *TP53*, *VHL*. Sequencing was performed on Ion 316Chip Kit v2 (Life Technologies) on the Ion Personal Genome Machine System (Life Technologies). Integrative Genomics Viewer (IGV 2.3) was used to exclude false-positive variants. Variants read with a minimum coverage of X100, with a frequency greater than 5%, were reported.

PTPN11 and *PTEN* mutations were not detected in any of the samples. However, sample no. 1 showed *KDR* p.Asp257Asn, *GNAQ* p.Val240Met and *ATM* p.Ala2883Val missense single nucleotide variants (SNV), none of which have been previously reported at the COSMIC database. *ATM* SNV was the only variant simultaneously predicted to be damaging at the protein level by both, SIFT (<http://sift.jcvi.org>) and PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>). As it was detected at a frequency lower than 20%, it could not be validated by Sanger sequencing. *ATM* inactivation and consequent defective DNA repair signalling may lead to accumulation of DNA damage and the emergence of mutations, increasing the risk of neoplasms development⁸ as shown in schematic (figure 2). Therefore, to test the possible functional effect of the missense *ATM* mutation detected, we assessed in our samples the immunohistochemical expression of two substrates of its pathway (phospho-Chk2

APÊNDICE B — Artigo científico II

Artigo científico aceito para publicação no periódico *Journal of Oral Pathology & Medicine*

MISS JOSIANE ALVES FRANÇA (Orcid ID : 0000-0002-6005-783X)

PROFESSOR RICARDO SANTIAGO GOMEZ (Orcid ID : 0000-0001-8770-8009)

DR CAROLINA CAVALIÉRI GOMES (Orcid ID : 0000-0003-1580-4995)

Article type : Original Article

Whole-exome sequencing reveals novel vacuolar ATPase genes' variants and variants in genes involved in lysosomal biology and autophagosomal formation in oral granular cell tumors

Running title: Oral granular cell tumor WES

Josiane Alves França¹,
Tenzin Gayden²,
Eric Bareke^{2,3},
Jean Nunes Santos⁴,
Sílvia Ferreira de Sousa⁵,
Luciana Bastos-Rodrigues⁶,
Jacek Majewski^{2,3},
Nada Jabado^{2,7},
Ricardo Santiago Gomez^{2*},
Carolina Cavaliéri Gomes^{1*},

¹Department of Pathology, Biological Sciences Institute, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

²Department of Human Genetics, McGill University, Montreal, Canada.

³McGill Genome Centre, Montreal, Canada.

⁴Department of Oral Pathology, School of Dentistry, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brazil.

⁵Department of Oral Surgery and Pathology, Faculty of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

⁶Department of Nutrition, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process, which may lead to differences between this version and the [Version of Record](#). Please cite this article as [doi: 10.1111/JOP.13148](https://doi.org/10.1111/JOP.13148)

This article is protected by copyright. All rights reserved

APÊNDICE C – Correspondência entre as amostras

Tabela de correspondência entre as amostras da 1ª Parte e da 2ª Parte desse estudo.

1ª Parte	2ª Parte
<i>targeted</i> NGS e IHQ	WES e Sanger
TCG oral 1	TCG oral 3
TCG oral 2	TCG oral 4
TCG oral 3	TCG oral 5A
TCG oral 4	TCG oral 6
TCG oral 5	TCG oral 1
TCG oral 6	TCG oral 2

NGS: *Next-Generation Sequencing*, IHQ: Imuno-Histoquímica, WES: *Whole-exome Sequencing*, TCG: Tumor de Células Granulares.