

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE MUTAÇÕES  
SOMÁTICAS EM UMA COORTE DE PACIENTES  
COM ADENOCARCINOMA GÁSTRICO**

**HELANO CARIOCA FREITAS**

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

**Área de concentração: Oncologia**

**Orientador: Dr. Emmanuel Dias Neto**

**Co-Orientador: Dra. Maria Dirlei Begnami**

**São Paulo**

**2019**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Freitas, Helano Carioca

**Avaliação do perfil de mutações somáticas em uma coorte de pacientes com adenocarcinoma gástrico** / Helano Carioca Freitas - São Paulo, 2019.

112p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Oncologia.

Orientador: Emmanuel Dias Neto

Descritores: 1. Neoplasias Gástricas/Stomach Neoplasms. 2. Estudos de Coortes/Cohort Studies. 3. Mutação/Mutation. 4. Linhagem/Pedigree. 5. Biomarcadores Tumoraes/Biomarkers, Tumor. 6. Estudos Retrospectivos/Retrospective Studies. 7. Sequenciamento Completo do Exoma/Whole Exome Sequencing.

## DEDICATÓRIA

*“Non est ad astra mollis e terris via” -*  
“Não há caminho fácil da Terra às estrelas”.

**Lucius Annaeus Seneca (4 a.C. - 65)**

*Às amadas mulheres da minha vida:  
Débora, Marina e Ana, pilares da minha existência.  
E à memória do meu filho Rafael...*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente ao querido e saudoso Prof. Ronaldo Ribeiro, meu primeiro mentor, que me apresentou ao mundo da Ciência.

Agradeço especialmente ao Prof. Roger Chammas, que me acolheu em minha primeira jornada no doutorado uma década atrás. E que silenciosamente respeitou e apoiou minha difícil decisão de fugir no momento mais difícil da minha existência.

Ao Dr. Marcello Fannelli, que me acolheu de volta ao A.C. Camargo Cancer Center em 2012.

À Dra. Vilma Martins, que me acolheu no CIPE e me levou ao Dr. Emmanuel Dias e ao *Medical Genomics Lab* pela mão.

Ao meu orientador, Dr. Emmanuel Dias, pela paciência em orientar um clínico atarefado, por sua capacidade de traduzir a complexidade da genômica em palavras simples para um clínico entender, por sua admirável visão da Ciência e por sua disponibilidade.

À Dra. Maria Dirlei Begnami, minha co-orientadora, pelo suporte nas análises de Patologia deste estudo.

À Dra. Diana Nunes pelo suporte na confecção do painel, pelo suporte técnico no sequenciamento, e por sua vibração e entusiasmo com o projeto desde o início.

Às técnicas do biobanco, Eloisa Olivieri, Ana Paula Suenaga e Louise Mota e ao técnico da Patologia, Severino Ferreira, pela qualidade do seu trabalho e pela ajuda na disponibilização das amostras usadas nesse estudo de forma ágil, apesar da sobrecarga de suas rotinas.

Às Dras. Maria Galli de Amorim e Thais Bartelli, por sua dedicação e competência e pelo imenso suporte na realização do sequenciamento das amostras, etapa central desse estudo.

À equipe de bioinformática, especialmente ao Dr. Israel Tojal, ao Renan Valieris e ao Alexandre Defelicibus, pelo imprescindível suporte neste projeto.

À aluna de doutorado Irina Bobrovnitchaia, pela ajuda nas análises de Epstein-Barr.

Aos colegas Marcelo Corassa, Augusto Obuti, Bianca Bonetti e Elizabete Caires, que ajudaram na coleta de dados clínicos quando eram residentes.

Ao Dr. Wilson da Costa Jr., que gentilmente cedeu parte de seu banco de dados clínicos para este projeto.

À Dra. Luiza Araújo pelo suporte nas análises de ancestralidade e por me guiar em meus primeiros passos no mundo do R.

Ao Dr. Victor Hugo Fonseca, que também me ajudou em meus primórdios nas análises clínicas em R e com quem regularmente discuto e aprendo sobre R e estatística.

À bibliotecária Suely Francisco, um agradecimento atual pelo suporte com a editoração final desta tese e um reconhecimento tardio pelo conjunto da obra, por sua dedicação à Biblioteca do A.C. Camargo Cancer Center e por ter conseguido para mim incontáveis artigos científicos desde o longínquo ano de 2001, mesmo quando eu estive longe.

À Sheila Silva, por me ajudar nas submissões regulatórias.

À minha querida equipe do CAPEC (Centro de Apoio à Pesquisa Clínica), de quem eu me distanciei na reta final deste estudo, por todo o apoio e por compartilhar comigo o sonho da Pesquisa Clínica.

A Vanessa Lima, Sueli Barbosa e Ronald Tamborelli, por me ajudarem a organizar minha atribulada rotina clínica.

Aos colegas da Oncologia Clínica, pelo suporte em minhas ausências e pelo companheirismo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão do financiamento ao projeto temático “Genômica e Epidemiologia do Câncer Gástrico no Brasil (processo 14/26897-0), que permitiu a realização deste trabalho.

Aos pacientes que consentiram que seus dados e amostras fossem usados em projetos de pesquisa como este, buscando melhores perspectivas para futuros pacientes.

Aos meus queridos sogros, Manoel e Claudete, pelo suporte que dão à minha família em minhas ausências.

Aos meus amados pais, Djanira e Perboyre, pelo sacrifício que fizeram para dar aos filhos uma boa educação e pelo exemplo de retidão e generosidade.

Aos meus irmãos, Fred e Victor, fontes de inspiração desde a infância e eternos incentivadores.

E às minhas amadas Débora e Marina e Ana, agradeço imensamente o apoio e a compreensão pelas ausências. O amor de vocês me fortalece...

## RESUMO

Freitas HC. **Avaliação do perfil de mutações somáticas em uma coorte de pacientes com adenocarcinoma gástrico.** São Paulo; 2019. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

**INTRODUÇÃO:** O adenocarcinoma gástrico (AdG) é responsável por 5,7% de todos os casos novos e por 8,2% das mortes relacionadas a câncer no mundo. A literatura sobre AdG tem enriquecido com a publicação de amplas análises moleculares nos últimos anos, mas boa parte delas carece de dados de sobrevida e do impacto prognóstico das alterações descritas

**OBJETIVOS:** 1) Descrever o perfil mutacional e avaliar o impacto prognóstico das mutações mais relevantes de AdGs em uma coorte de 112 pacientes tratados no A.C. Camargo Cancer Center; 2) Determinar a ancestralidade genômica e seu impacto prognóstico nesta coorte; 3) Investigar o impacto da carga mutacional global do tumor sobre o prognóstico; 4) Buscar novos marcadores moleculares prognósticos através do sequenciamento comparativo do exoma tumoral completo de 24 pacientes da mesma coorte.

**MÉTODOS:** Este é um estudo longitudinal, retrospectivo, com amostragem não-aleatória e consecutiva de 112 pacientes com AdG, independente de estágio clínico, com amostras disponíveis no biobanco institucional e diagnóstico entre 2007 e 2013. O DNA tumoral foi sequenciado com um painel de captura incluindo 99 genes e 24 amostras também tiveram o exoma tumoral completo sequenciado.

Utilizamos um pool de 1600 marcadores informativos de ancestralidade para determinar a ancestralidade genômica dos casos. **RESULTADOS:** Os dez genes mais frequentemente mutados em nossa coorte foram *TP53* (30%), *LAMA1* (21%), *ARID1A* (19%), *CIC* (19%), *FAT4* (17%), *PKHD1* (16%), *KMT2C* (15%), *MACF1* (15%), *PKHDL1* (15%) e *BRCA2* (14%). Demonstramos que em uma população etnicamente miscigenada como a brasileira, a ancestralidade genômica asiática *per se* não representa um

fator prognóstico independente e levantamos a hipótese de que em nossa população, a ancestralidade predominante africana talvez esteja associada a um prognóstico adverso. Identificamos a presença de mutações em *RHOA* como um possível fator associado a prognóstico favorável, dado que ainda carece de validação. Demonstramos que *FAT4*, *ARID1A* e *BRCA2* são genes frequentemente mutados em nossa coorte e, ao contrário de relatos prévios, não estiveram associados ao prognóstico de pacientes com AdG.

**Descritores:** Neoplasias Gástricas. Estudos de Coortes. Mutação. Linhagem. Biomarcadores Tumorais. Estudos Retrospectivos. Sequenciamento Completo do Exoma

## SUMMARY

Freitas HC. [Tumor molecular profiling in a Brazilian cohort of gastric adenocarcinoma patients]. São Paulo; 2019. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

**INTRODUCTION:** Gastric adenocarcinoma (AdG) accounts for 5.7% of all tumors and 8.2% of cancer related deaths worldwide. Comprehensive reports have recently contributed to the molecular characterization of AdG, but most of them have not investigated the possible prognostic impact of the described mutations. **OBJECTIVES:** 1) To identify molecular alterations and to assess the prognostic impact of the most relevant mutations found in a cohort of 112 AdG patients treated at A.C.Camargo Cancer Center; 2) To determine the genomic ancestry, for the same cohort, and its prognostic impact; 3) To assess the global tumor mutational burden and its prognostic impact 4) To screen potential new prognostic molecular alterations through whole exome sequencing (WES) of tumors from 24 patients. **METHODS:** This is a retrospective longitudinal analysis that recruited 112 AdG patients, all stages, diagnosed between 2007 and 2013, with available tissue at the A.C. Camargo Cancer Center biobank. DNA extracted from tumor samples was sequenced by a targeted gene panel including 99 genes. Twenty-four tumors were also assessed by WES. We used a pool of 1600 ancestry informative markers to infer each individual genomic ancestry. **RESULTS:** The top 10 mutated genes in our cohort were: *TP53* (30%), *LAMA1* (21%), *ARID1A* (19%), *CIC* (19%), *FAT4* (17%), *PKHD1* (16%), *KMT2C* (15%), *MACF1* (15%), *PKHD1* (15%) e *BRCA2* (14%). Different from other studies, Asian ancestry was not an independent prognostic factor in our ethnically highly-admixed population, but we found worse prognosis in African ancestry. Mutations in *RHOA* were associated with good prognosis in this cohort, and we also demonstrated that, besides being common among

Brazilian AdG patients, mutations in *FAT4*, *ARID1A* and *BRCA2* had no prognostic impact.

**Key-words:** Stomach Neoplasms. Cohort Studies. Mutation. Pedigree. Biomarkers, Tumor. Retrospective Studies. Whole Exome Sequencing.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Contabilização e classificação de mutações de acordo com os filtros utilizados nas chamadas de variantes (painel). .....	14
Figura 2 - Carga mutacional dos tumores com exoma sequenciado (seta) em comparação a outras coortes do TCGA. ....	18
Figura 3 - Quantidade de marcadores informativos de ancestralidade por amostra (N=112). ....	19
Figura 4. Distribuição dos casos de AdG deste estudo, de acordo com a faixa etária ao diagnóstico. ....	23
Figura 5 - Curvas de sobrevida global e sobrevida livre de doença da coorte inteira. ....	25
Figura 6 - Curvas de sobrevida global e sobrevida livre de doença de acordo com o estadiamento ao diagnóstico. ....	26
Figura 7 - Curvas de sobrevida global e sobrevida livre de doença de acordo com o sexo e a idade dos pacientes (<50 anos x ≥50 anos). ....	28
Figura 8 - Curvas de sobrevida global e sobrevida livre de doença de acordo com a localização do tumor (TEG x Distal). ....	31
Figura 9 - Sobrevida de acordo com o tipo histológico (OMS). ....	32
Figura 10 - Curvas de sobrevida nos adenocarcinomas em anel de sinete. ....	33
Figura 11 - Curvas de sobrevida global e sobrevida livre de doença de acordo com a classificação de Lauren (Intestinal x Difuso). ....	34
Figura 12 - Classificação das variantes e número de variantes por amostra. ....	37
Figura 13 - Oncoplot com os 30 genes de maior frequência mutacional entre os tumores analisados (n=112). ....	39
Figura 14 - Coorte A.C. Camargo Cancer Center (ACC) x TCGA (subgrupo com os mesmos 99 genes do painel de captura). ....	40
Figura 15 - Perfil mutacional de acordo com o grupo etário dos pacientes (<50 anos x ≥50 anos). ....	41
Figura 16 - Genes diferencialmente mutados de acordo com o grupo etário dos pacientes (<50 anos x ≥50 anos). ....	42
Figura 17 - Mutações por amostra segundo a localização do tumor. ....	43

Figura 18 - Dez genes mais mutados de acordo com a localização do tumor. ....	44
Figura 19 - Genes com frequência mutacional discrepante de acordo com a localização do tumor. ....	46
Figura 20 - Co-Oncoplots com frequências mutacionais de acordo com a localização do tumor. ....	47
Figura 21 - Genes com frequência mutacional discrepante entre adenocarcinoma tubular e demais histologias. ....	49
Figura 22 - Genes mais mutados e número de mutações por amostra nos AdG-SI difusos x não-difusos. ....	51
Figura 23 - Perfil mutacional dos tumores de tipo intestinal (n=46) e difuso (n=51). ....	52
Figura 24 - Genes diferencialmente mutados de acordo com o subtipo de Lauren. ....	53
Figura 25 - Genes com frequências mutacionais discrepantes entre AdG-I e AdG-D. ....	54
Figura 26 - Carga mutacional dos tumores x idade ao diagnóstico. ....	55
Figura 27 - Genes diferencialmente mutados de acordo com a carga mutacional dos tumores. ....	58
Figura 28 - Sobrevida global e sobrevida livre de doença de acordo com a CMT. ....	59
Figura 29 - TCGA x exoma completo na coorte ACC. ....	60
Figura 30 - Ancestralidade média da coorte. ....	63
Figura 31 - Determinação da ancestralidade genômica predominante nos casos da coorte (N=112). ....	65
Figura 32 - Sobrevida global e sobrevida livre de doença de acordo com a ancestralidade genômica predominante. ....	66
Figura 33 - Perfil mutacional dos tumores de acordo com a ancestralidade genômica predominante. ....	68
Figura 34 - Sobrevida global e sobrevida livre de doença de acordo com o <i>status</i> mutacional de RHOA. ....	69
Figura 35 - Análise de co-ocorrência e exclusividade mútua entre os 50 genes mais mutados nos tumores estudados. ....	70
Figura 36 - Genes com maior frequência mutacional nos casos hipermutados do TCGA. ....	95

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Genes com sequências de bases repetidas ( <i>tandem repeats</i> ) e/ou segmentos duplicados. ....	15
Tabela 2 - Características clínicas dos 112 casos da coorte. ....	24
Tabela 3 - Sobrevida livre de doença em 1, 2 e 5 anos. ....	26
Tabela 4 - Características clínicas dos casos segundo a localização do tumor (TEG x Distal). ....	30
Tabela 5. Características clínicas dos casos segundo a classificação de Lauren (Intestinal x Difuso). ....	35
Tabela 6 - FM de genes selecionados: TCGA x COSMIC x A.C. Camargo Cancer Center. ....	38
Tabela 7 - Características clínicas dos casos segundo a carga mutacional dos tumores (CMT). ....	56
Tabela 8 - Características clínicas dos casos com exoma sequenciado em comparação a coorte inteira. ....	61
Tabela 9 - Características clínicas dos casos de acordo com a ancestralidade genômica predominante. ....	64
Tabela 10 - Variantes observadas no gene <i>RHOA</i> . ....	70
Tabela 11 - Características clínicas dos casos com mutação de <i>RHOA</i> . ....	72

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>ABraOM</b>	Arquivo Brasileiro Online de Mutações
<b>AdG</b>	Adenocarcinoma gástrico
<b>AdG-D</b>	Adenocarcinoma gástrico difuso
<b>AdG-I</b>	Adenocarcinoma gástrico intestinal
<b>AdG-P</b>	Adenocarcinoma gástrico papilífero
<b>AdG-SI</b>	Adenocarcinoma gástrico em anel de sinete
<b>AdG-SOE</b>	Adenocarcinoma sem outras especificações
<b>AdG-T</b>	Adenocarcinoma gástrico tubular
<b>BQRS</b>	<i>Base Quality Score Recalibration</i>
<b>CIN</b>	Instabilidade Cromossômica ( <i>Chromosome Instability</i> )
<b>CMT</b>	Carga mutacional dos tumores
<b>CNA</b>	<i>Copy number alterations</i>
<b>CNV</b>	<i>Copy number variation</i>
<b>CPD</b>	Carcinoma pouco diferenciado
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico
<b>DP</b>	Desvio Padrão
<b>EBV</b>	Vírus Epstein Barr
<b>EC</b>	Estádio Clínico
<b>ePCR</b>	“PCR” em emulsão
<b>ExAC</b>	<i>Exome Aggregation Consortium</i>
<b>FA</b>	Frequência Alélica
<b>FDR</b>	<i>False Discovery Rate</i>
<b>FM</b>	Frequência mutacional
<b>GATK</b>	<i>Genome Analysis Toolkit</i>
<b>GS</b>	Genomicamente Estável ( <i>Genomic Stable</i> )
<b>HR</b>	<i>Hazard ratio</i>
<b>IARC</b>	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
<b>IC</b>	Intervalo de confiança
<b>IDH</b>	Índice de Desenvolvimento Humano

<b>INCA</b>	Instituto Nacional do Câncer
<b>InDels</b>	Inserções e Deleções
<b>MIA</b>	<i>Marcador Informativo de Ancestralidade</i>
<b>MSI</b>	<i>Microsatellite instability</i>
<b>MSS</b>	<i>Microsatellite stable</i>
<b>NS</b>	Não-sinônima
<b>NS/S</b>	Relação não sinônimas/sinônimas
<b>PCR</b>	<i>Polymerase chain reaction</i>
<b>PMT</b>	Perfil mutacional dos tumores
<b>RC</b>	Regiões codificadoras
<b>SLD</b>	Sobrevida livre de doença
<b>SG</b>	Sobrevida global
<b>SPNs</b>	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
<b>SVN</b>	<i>Single nucleotide variant</i>
<b>TCGA</b>	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
<b>TEG</b>	Transição esôfago-gástrica
<b>TR</b>	<i>Tandem repeats</i>
<b>UTRs</b>	<i>Untranslated regions</i>
<b>WES</b>	<i>Whole exome sequencing</i>

# ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>8</b>
2.1	Objetivo Geral.....	8
2.2	Objetivos Específicos .....	8
<b>3</b>	<b>CASUÍSTICA E MÉTODOS</b> .....	<b>9</b>
3.1	População do Estudo .....	9
3.2	Métodos.....	10
3.2.1	Seleção de genes alvo e construção do painel gênico.....	10
3.2.2	Construção das bibliotecas e sequenciamento do painel gênico .....	10
3.2.3	Sequenciamento e análise do exoma.....	11
3.2.4	Painel - Análise bioinformática e definição de filtros para chamada de variantes .....	11
3.2.5	Exomas - Análise bioinformática e definição de filtros para chamada de variantes .....	16
3.2.6	Inferência de ancestralidade genômica .....	17
3.2.7	Detecção do vírus de Epstein Barr nas amostras tumorais.....	19
3.2.8	Definição da carga mutacional dos tumores (CMT).....	20
3.2.9	Base de dados do TCGA.....	20
3.2.10	Análises estatísticas .....	21
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>23</b>
4.1	Características clínicas.....	23
4.1.1	Sobrevida global e sobrevida livre de doença (coorte total).....	25
4.1.2	Sexo .....	26
4.1.3	Idade ao diagnóstico (<50 anos x ≥50 anos).....	27
4.1.4	Localização do tumor .....	28
4.1.5	Tipo histológico dos tumores (OMS) .....	31

4.1.6	Tipo histológico dos tumores (Lauren) .....	33
4.2	Perfil mutacional dos tumores (PMT) .....	36
4.2.1	PMT de acordo com a idade dos pacientes (<50 anos x >50 anos)..	39
4.2.2	PMT segundo a localização do tumor .....	43
4.2.3	PMT de acordo com o tipo histológico (OMS) .....	48
4.2.4	PMT de acordo com o subtipo de Lauren.....	51
4.4.5	Carga mutacional dos tumores (CMT).....	55
4.4.6	Exomas.....	59
4.4.7	Ancestralidade genômica .....	62
4.4.8	Impacto prognóstico de RHOA.....	69
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>73</b>
5.1	Sobrevida e fatores clínicos.....	76
5.2	Perfil mutacional dos tumores .....	80
5.2.1	Idade ao diagnóstico (<50 anos x ≥50 anos).....	87
5.2.2	Localização do tumor .....	90
5.2.3	Tipo histológico.....	91
5.2.4	Carga mutacional dos tumores.....	93
5.3	Ancestralidade.....	96
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>103</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>105</b>

## **ANEXO**

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

## **APÊNDICE**

**Apêndice 1** Lista de genes do painel

**Apêndice 2** Tabela de variantes

## 1 INTRODUÇÃO

O adenocarcinoma gástrico (AdG) é responsável por 5,7% de todos os casos novos e por 8,2% das mortes relacionadas a câncer no mundo. Globalmente, estima-se que cerca de 1 milhão de pessoas tenham sido diagnosticadas e mais de 780 mil tenham morrido em decorrência desta doença apenas no ano de 2018 (BRAY et al. 2018).

A incidência e a mortalidade por AdG são fortemente associadas com baixos índices de desenvolvimento humano (IDH), e mais de 70% dos casos ocorrem em países em desenvolvimento. Segundo dados do GLOBOCAN, em 2008 foram estimados 16,7 casos novos de AdG por 100.000 habitantes nos países com alto IDH em comparação a 21,1 casos novos por 100.000 habitantes nos países com IDH baixo. No mesmo ano, foram estimadas 10,4 mortes por 100.000 habitantes relacionadas ao AdG nos países com alto IDH em comparação a 16 mortes por 100.000 habitantes nos países com baixo IDH (BRAY et al. 2012; JEMAL et al. 2011).

As regiões com maior incidência de AdG são o leste da Ásia e da Europa e a América do Sul. No Brasil, em 2018 foram estimados cerca de 21 mil casos novos de AdG, com um risco estimado de 13:100 mil habitantes em homens e 7:100 mil habitantes em mulheres (Ministério da Saúde 2018). Segundo dados da *International Agency for Research on Cancer* (IARC), em números absolutos o Brasil é o sétimo país com maior incidência (20.927 casos) e prevalência (28.084) de AdG, atrás de China, Japão, Índia, Coréia do Sul, Rússia e EUA (GLOBOCAN 2018a). Esses números posicionam o Brasil como o país com maior número de casos de AdG na América Latina (GLOBOCAN 2018b).

Mais de 90% dos tumores malignos do estômago são adenocarcinomas. Contudo, mesmo entre os AdG a evolução clínica dos pacientes é distinta e influenciada por fatores tão diversos quanto a localização do tumor (proximal x distal), subtipo histológico (padrão intestinal

x difuso), aspectos moleculares (hiperexpressão de HER2) e etnia (asiáticos x não asiáticos).

Em geral, tumores proximais de estômago têm comportamento mais agressivo em comparação aos tumores distais, com maior tendência a invasão esofágica, metástases linfonodais e pior prognóstico (TAJIMA et al. 2007).

A classificação histológica da Organização Mundial de Saúde (OMS) divide os AdG nos subtipos tubular, papilífero, mucinoso ou em anel de sinete (BOSMAN et al. 2010). No entanto, a classificação proposta por Lauren em 1965 define dois subtipos histológicos de AdG (intestinal e difuso) de acordo com sua estrutura glandular e tem uso amplo e corriqueiro na prática clínica (LAUREN 1965). Estes subtipos histológicos apresentam distinções que vão muito além de suas características observáveis ao microscópio.

O AdG de padrão intestinal (AdG-I) é mais frequente em áreas geográficas de alto risco como a Ásia, predomina em homens (1,8:1) com idade mais avançada e correlaciona-se com exposição ao *H. pylori*. Está fortemente relacionado a inflamação crônica e sua sequência de eventos histopatológicos é bem descrita: gastrite crônica ativa não atrófica, atrofia multifocal, metaplasia intestinal (completa, depois incompleta), displasia e neoplasia (CORREA e HOUGHTON 2007).

O tipo difuso (AdG-D), por outro lado, apresenta distribuição geográfica mais uniforme, sem predileção por sexo nem correlação aparente com a prevalência de *H. pylori*, desenvolve-se na mucosa gástrica sem sinais de inflamação crônica ou atrofia e uma de suas formas de apresentação, a linite plástica, está associada a prognóstico desfavorável (SAKAMOTO et al. 2008). Uma análise recente de 118.367 pacientes com AdG operados, descreveu uma sobrevida global (SG) em 5 anos de 76% (IC 95% 75-76) para os AdG-I, 67% (IC95% 66-67) para os AdG-D e 47% (IC95% 43-50) para os demais casos ( $p < 0,001$ ) (KATAI et al. 2018).

O AdG parece ter características e evolução clínica diferentes entre pacientes de origem asiática em comparação aos não-asiáticos. A sobrevida

em 5 anos de pacientes japoneses considerando todos os estádios clínicos é de 40 a 60% em comparação a apenas 15 a 20% nos Estados Unidos e Europa. Na Ásia predominam os AdG distais, enquanto nos países ocidentais observa-se uma maior incidência de tumores de cárdia (KIM et al. 2010).

Um estudo recente analisou dados de 13.084 pacientes com AdG diagnosticados entre 1988 a 2006 oriundos do registro de base populacional de Los Angeles, nos Estados Unidos. A amostra continha 39% de pacientes declarados brancos, 28% de hispânicos, 22% de asiáticos, 11% de negros e 2% de outros grupos étnicos. Claramente os pacientes asiáticos apresentaram melhor sobrevida (mediana 16,3 meses) em relação a brancos, hispânicos e negros (8,4 meses, 8,7 meses e 7,9 meses, respectivamente;  $p < 0,001$ ) (KIM et al. 2010). Por ter avaliado pacientes tratados nos Estados Unidos, este estudo ajuda a afastar uma das hipóteses vigentes de que a melhor evolução dos pacientes asiáticos estaria relacionada aos métodos de tratamento utilizados no Oriente (melhor tratamento cirúrgico).

A resposta a tratamentos sistêmicos também parece diferir entre pacientes com distintos componentes étnicos. Por exemplo, no estudo AVAGAST, que avaliou o papel de um agente antiangiogênico (bevacizumabe) em associação à quimioterapia no tratamento de pacientes com câncer gástrico metastático, a resposta ao tratamento foi diferente entre pacientes asiáticos e pacientes oriundos do continente americano (OHTSU et al. 2011).

Neste estudo, a adição de bevacizumabe não resultou em ganho de sobrevida em asiáticos (13,9 meses para os tratados com quimioterapia/bevacizumabe e 12,1 meses naqueles tratados com quimioterapia/placebo; HR 0,97 IC95% 0,75-1,25). Já o subgrupo de pacientes oriundos da América foi o que apresentou os piores dados de sobrevida e o único em que o novo tratamento parece ter apresentado algum benefício (11,5 meses no braço quimioterapia/bevacizumabe e 6,5 meses no braço quimioterapia/placebo; HR 0,63 IC95% 0,43-0,94). Chama

atenção a evolução dos casos no braço controle. Embora tenham recebido a mesma intervenção no estudo (quimioterapia + placebo), os asiáticos apresentaram mediana de SG 12,1 meses em comparação a apenas 6,5 meses para os indivíduos oriundos do continente americano.

Do ponto de vista molecular, a hiperexpressão da proteína HER2 (receptor do fator de crescimento epidérmico 2), mais frequentemente observada nos AdG-I (16%-34%) do que nos AdG-D (2%-7%), tem sido associada a um pior prognóstico (BEGNAMI et al. 2011; HECHTMAN e POLYDORIDES 2012).

Atualmente, HER2 é utilizado na prática clínica diária para definir o tratamento de pacientes com AdG metastático com terapia alvo. HER2 amplificado ou com forte expressão tecidual por imunohistoquímica (3+) é um fator preditivo positivo de resposta ao trastuzumabe, anticorpo monoclonal anti-HER2 usado em associação à quimioterapia.

O estudo TOGA demonstrou que o acréscimo de trastuzumabe à quimioterapia convencional com fluoropirimidina e cisplatina em pacientes com hiperexpressão de HER2 foi associado a um robusto incremento da mediana de sobrevida de 11,8 meses para 16 meses (HR 0,65; IC95% 0,51-0,83) (BANG et al. 2010). No entanto, esta alteração é relativamente rara. Em uma coorte de 221 pacientes do A.C. Camargo Cancer Center, apenas 12% apresentaram hiperexpressão de HER2 (BEGNAMI et al. 2011).

Estudos recentes têm tentado caracterizar de maneira mais ampla o perfil molecular dos pacientes com AdG. WANG et al. 2011 identificaram alterações moleculares que permitiram o agrupamento dos pacientes com AdG em subtipos moleculares distintos. Ao sequenciarem o exoma completo de 22 amostras de AdG, estes autores identificaram diversas mutações novas, em vias cujo envolvimento no AdG não havia sido previamente descrito. De modo marcante, alterações no gene *ARID1A* foram encontradas em 83% dos AdG com instabilidade de microssatélites (MSI), em 73% dos AdG associados ao vírus Epstein-Barr (EBV), e em apenas 11% dos AdG sem MSI e negativos para EBV. A ocorrência de mutações em *ARID1A* se correlacionou negativamente com a presença de mutações em *TP53*.

Clinicamente, neste estudo de apenas 22 indivíduos, a presença de mutações em *ARID1A* foi associada a um melhor prognóstico, independente do estadiamento do paciente (WANG et al. 2011). Recentemente, uma meta-análise de 14 estudos envolvendo 3.183 pacientes com AdG associou a perda de expressão de *ARID1A* a um prognóstico desfavorável (HR=1,60; IC95% 1,40-1,81; P < 0,001). Digno de nota, neste estudo o prognóstico adverso de *ARID1A* foi observado em pacientes asiáticos, mas não foi visto nos pacientes não-asiáticos (YANG et al. 2016).

KAKIUCHI et al. (2014) sequenciaram o exoma completo (WES) de 30 amostras de AdG-D. A análise de WES indicou uma alta frequência de mutações em *RHOA* que em geral tinham como consequência um ganho de função desta proteína, membro da família das RHO GTPases. Este achado foi confirmado em um segundo grupo de amostras e, em conjunto, os dados indicam que cerca de ¼ dos AdG-D sejam carreadores de mutações neste gene, caracterizando-a como um potencial alvo para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas que tenham *RHOA* como alvo.

Visando uma análise genômica integrada do AdG, outro estudo recente avaliou 100 pares de amostras tumorais e não-tumorais de estômago através do sequenciamento completo do DNA, análise de variações do número de cópias (CNV) de regiões genômicas, perfil de metilação global e expressão gênica (WANG et al. 2014). Genes conhecidamente importantes em AdG se encontraram alterados (*TP53*, *ARID1A* e *RHOA*), assim como novos *driver* genes foram identificados (*MUC6*, *CTNNA2*, *GLI3*, *RNF43* e outros). Os autores descreveram ainda alterações genéticas e epigenéticas diferenciais entre os subgrupos moleculares previamente descritos (EBV+ e MSI).

Mais recentemente, o consórcio *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) completou o estudo de 295 pares de amostras tumor x mucosa gástrica não tumoral. Utilizando seis diferentes plataformas de análise, incluindo perfis de expressão de miRNAs e mRNAs, metilação, CNVs e WES, o consórcio propôs uma nova classificação molecular para o AdG em quatro grupos: EBV+ (26/295 - 8,8%), MSI+ (64/295 - 21,7%), CIN (*Chromosome Instability*

ou instabilidade cromossômica - 147/295 - 40,8%) e GS (*Genomic Stable* ou genomicamente estável, 58/295 - 19,7%). Tumores EBV+ apresentaram hipermetilação em regiões promotoras e níveis elevados de mutações em *PIK3CA* (80% dos casos), com maior tendência de ocorrência no fundo ou corpo gástrico (62%,  $p=0,02$ ); tumores MSI demonstraram alta carga de mutações e também apresentaram hipermetilação. Os outros dois grupos (CIN e GS) foram definidos com base na presença ou ausência de CNA (*copy number alterations*) (The Cancer Genome Atlas Research Network 2014).

Os tumores MSI+ ocorreram em indivíduos com idade mais avançada (mediana de 72 anos,  $p=5 \times 10^{-5}$ ), em contraste com tumores GS, com tendência de ocorrência em idade menos avançada (59 anos,  $p=4 \times 10^{-7}$ ) e enriquecidos para o subtipo difuso de Lauren (40/55 = 73%,  $p=7,5 \times 10^{-7}$ ) (The Cancer Genome Atlas Research Network 2014) .

Esses trabalhos contribuíram para o conhecimento dos diversos genes relacionados ao AdG e sua análise conjunta demonstra o achado recorrente de mutações em determinados genes como *TP53*, *ARID1A*, *CDH1*, *RHOA*, *LAMA1*, dentre outros. No entanto os dados são derivados de um número ainda limitado de pacientes avaliados em alguns poucos países e com um claro viés para Europa, Estados Unidos e Ásia. Deste modo, o conhecimento precisa avançar para a melhor compreensão do real papel desses e de outros genes na patogênese e na evolução clínica de pacientes com AdG e dentro do contexto de distintas contribuições de populações parentais na composição étnica dos pacientes. Assim, poderemos avaliar qual o real impacto prognóstico de mutações em genes específicos e averiguar se perfis mutacionais distintos podem explicar a evolução clínica e a história natural discrepante entre, por exemplo, tumores proximais e distais, tumores do tipo intestinal ou difuso e tumores na forma de linite plástica.

A grande complexidade e diversidade de técnicas utilizadas nos estudos citados anteriormente, sem mencionar seus altos custos, dificultam a aplicabilidade clínica da classificação molecular proposta no TCGA.

Painéis gênicos customizados, cuidadosamente elaborados para avaliar tumores específicos, representam uma alternativa mais barata e definitivamente mais ágil do que o sequenciamento do genoma ou do exoma tumoral, além de permitirem maior cobertura vertical e alta sensibilidade na detecção de mutações de menor frequência em uma dada amostra. Assim, a partir das informações disponíveis sobre os genes comumente mutados, aliado a um estudo mais amplo envolvendo exomas completos em populações de interesse, é possível confeccionar painéis gênicos para caracterizar perfis moleculares no AdG e investigar a possível correlação dos achados com o prognóstico.

Apesar do ritmo acelerado de publicações recentes descrevendo novas alterações moleculares no AdG, ainda há pouca informação focada na diferenciação molecular entre as formas de apresentação da doença quanto à localização, tipo histológico, idade ao diagnóstico etc. Além disso, a literatura é escassa a respeito do impacto prognóstico das alterações moleculares no AdG, principalmente no que diz respeito a pacientes fora do eixo Europa-Estados Unidos-Ásia.

A despeito do debate sobre a discrepância na evolução clínica entre pacientes ocidentais e orientais com AdG, até o momento não há informações na literatura correlacionando a ancestralidade genômica dos pacientes com as características clínicas e os desfechos de sobrevida.

Por fim, a literatura carece de relatos sobre o perfil de mutações no AdG em pacientes brasileiros. O presente estudo busca investigar essas questões e assim contribuir para o avanço no conhecimento científico desta importante patologia.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Descrever o perfil mutacional e avaliar o impacto prognóstico das mutações encontradas nos AdGs em uma coorte de pacientes tratados no A.C. Camargo Cancer Center

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar o perfil mutacional dos tumores desta coorte por sequenciamento de nova geração, a partir de painéis gênicos customizados e sequenciamento completo de exoma;
- Determinar a ancestralidade genômica e as características clínicas dos pacientes desta coorte de modo a investigar uma possível relação destes parâmetros com aspectos prognósticos;
- Para os genes do painel, investigar o impacto de: (a) mutações específicas, (b) da ocorrência simultânea de mutações em dois ou mais genes do painel e (c) da frequência mutacional no tumor sobre o prognóstico da doença;
- Realizar uma análise exploratória em busca de novos marcadores moleculares prognósticos através do sequenciamento e comparação do exoma tumoral completo de um subgrupo de tumores.

### 3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

#### 3.1 POPULAÇÃO DO ESTUDO

Este é um estudo longitudinal, retrospectivo, que avaliou uma coorte fixa de 112 pacientes com carcinoma gástrico quanto a aspectos clínicos, perfis mutacionais dos tumores e ancestralidade genômica dos pacientes.

##### **Critérios de inclusão:**

- Pacientes com diagnóstico de carcinoma gástrico, anterior a 2013, independente do estágio clínico ou do subtipo tumoral, tratados no A.C. Camargo Cancer Center
- Para todos os casos é obrigatória a existência de amostras de tecido tumoral armazenadas em parafina ou congeladas, em condições satisfatórias para extração de DNA em qualidade e quantidade suficientes para a realização do estudo.

##### **Critério de exclusão:**

- Pacientes abaixo de 35 anos
- Pacientes com diagnóstico confirmado ou alta suspeição para tumores hereditários. Casos sem diagnóstico definitivo, mas com alta suspeição para síndrome genética de câncer hereditário foram excluídos.
- Tumores neuroendócrinos, linfomas e sarcomas foram excluídos.

A amostragem foi do tipo não-aleatória, por conveniência e consecutiva, utilizando os casos oriundos do biobanco institucional que preencheram os critérios do estudo e que continham amostras disponíveis no momento da realização do projeto.

Todos os pacientes consentiram voluntariamente em disponibilizar as amostras biológicas para armazenamento no biobanco institucional e para

uso com fins de pesquisa, seguindo as *Diretrizes Nacionais para Biorrepositório e Biobanco de Material Biológico Humano com Finalidade de Pesquisa* (portaria nº 2.201 do Ministério da Saúde, de 14 de setembro de 2011).

O projeto (CAEE 38516714.3.0000.5432) foi aprovado no Comitê de Ética do A.C. Camargo Cancer Center em 22/01/2015, sob o parecer nº 936.593. (Anexo 1)

## **3.2 MÉTODOS**

### **3.2.1 Seleção de genes alvo e construção do painel gênico**

A partir de descrições recentes na literatura dos genes mais frequentemente mutados em AdG, selecionamos 99 genes para a construção do painel de captura (KAKIUCHI et al. 2014; The Cancer Genome Atlas Research Network 2014; WANG et al. 2014) (Apêndice 1).

O painel foi desenhado utilizando a plataforma NimbleGen (Roche, USA) e avaliado manualmente para cada éxon de cada um dos genes selecionados (*UCSC Genome Browser*, <https://genome.ucsc.edu/>). As sondas desenhadas para os éxons dos genes que compõem o painel permitiram a cobertura horizontal de 781.132pb (99,7% das regiões-alvo), sendo que as poucas regiões que não foram cobertas são constituídas por elementos repetitivos do genoma.

### **3.2.2 Construção das bibliotecas e sequenciamento do painel gênico**

O DNA foi extraído pelo Banco de Macromoléculas do A.C. Camargo Cancer Center a partir de amostras de tecido congeladas e armazenadas no Biobanco institucional, utilizando o kit QIASymphony THC 400 (Qiagen). O DNA genômico (100ng) do tecido tumoral foi utilizado para o enriquecimento por captura das regiões incluídas no painel customizado. As bibliotecas foram preparadas seguindo as instruções do fabricante SeqCap EZ Library SR User's Guide Version 5.1 - NimbleGen, Roche). As bibliotecas foram quantificadas por PCR quantitativo em tempo real com o KAPA Library

Quantification Kit (Illumina platforms), diluídas, e concentrações equimolares das bibliotecas foram sequenciadas na plataforma HiSeq 500 (Illumina) utilizando *paired-end reads* (2x 75pb), disponível em nossos laboratórios.

### 3.2.3 Sequenciamento e análise do exoma

Visando redução de custos, o sequenciamento completo do exoma tumoral foi realizado pela empresa Macrogen (Seul, Coréia do Sul), para um total de 24 amostras (21,4% da coorte). Para isto, 200ng de DNA tumoral foram enviados para a empresa, que seguiu com a preparação das bibliotecas com o kit Agilent SureSelect V6 e o sequenciamento na plataforma HiSeq 4000 (Illumina), utilizando *paired-end reads* (2x 100pb) e visando uma cobertura inicial de pelo menos 100x.

### 3.2.4 Painel: Análise bioinformática e definição de filtros para chamada de variantes

As sequências foram alinhadas ao genoma humano de referência GRCh37 utilizando a ferramenta BWA MEM (<https://bit.ly/2J2BhZX>). O pré-processamento das amostras foi realizado de acordo com as melhores práticas do GATK (*Genome Analysis Toolkit* - <https://bit.ly/2ZJbRq9>), que inclui a remoção de duplicatas com a ferramenta Picard (<https://bit.ly/2ZL3vhK>), realinhamento de InDels (Inserções e Deleções) e re-calibração de escores de qualidade de base (BQSR - *Base Quality Score Recalibration*). Em seguida, as variantes foram chamadas utilizando a ferramenta HaplotypeCaller do GATK. Variantes presentes em menos de 5 leituras e que não atenderam aos *hard filters* recomendados pelo GATK (filtros de qualidade de mapeamento, viés de posição e *strand bias*) foram desconsideradas. Variantes silenciosas, variantes em regiões intrônicas ou intergênicas e variantes localizadas em alguma das UTRs (*untranslated regions*) também não foram contabilizadas para o cálculo das frequências mutacionais.

Essa chamada inicial (filtro 1) retornou 19.788 variantes, com uma média de 177 variantes por amostra e uma mediana 176. Filtros adicionais foram aplicados principalmente visando excluir os polimorfismos (variantes

germinativas) presentes em meio às mutações somáticas das células tumorais. Cada novo filtro foi aplicado em adição aos filtros anteriores.

O filtro 2 excluiu todas as variantes com frequência superior a 1% no banco de dados ExAC (*Exome Aggregation Consortium* - <http://exac.broadinstitute.org>). A chamada de variantes após o filtro 2 resultou em 4.634 variantes, com média 41 e mediana 38 variantes por amostra.

Posteriormente aplicamos o filtro 3, onde excluímos as variantes presentes no Arquivo Brasileiro Online de Mutações (ABraOM, coorte SABE609 - <http://abraom.ib.usp.br/about.php>), que possivelmente contém variantes mais frequentes na população brasileira. A chamada de variantes após o filtro 3 resultou em 2.157 variantes, com média 19 e mediana 16 variantes por amostra.

A seguir, já que obtivemos DNA de leucócitos em 16 casos da coorte e realizamos o sequenciamento do exoma destas amostras, utilizamos estes dados para gerar um pequeno *pool* de variantes polimórficas com parte da coorte. Assim, implementamos o filtro 4 que excluiu estas variantes, resultando em 1.219 variantes, com média 11 e mediana 7 variantes por amostra.

Mesmo com a aplicação de todos esses filtros, alguns genes apresentavam frequências mutacionais (FM) ainda muito elevadas, se comparadas a outros estudos reportados na literatura, tais como *MUC6* (FM: 90%) e *FLG* (FM: 29%).

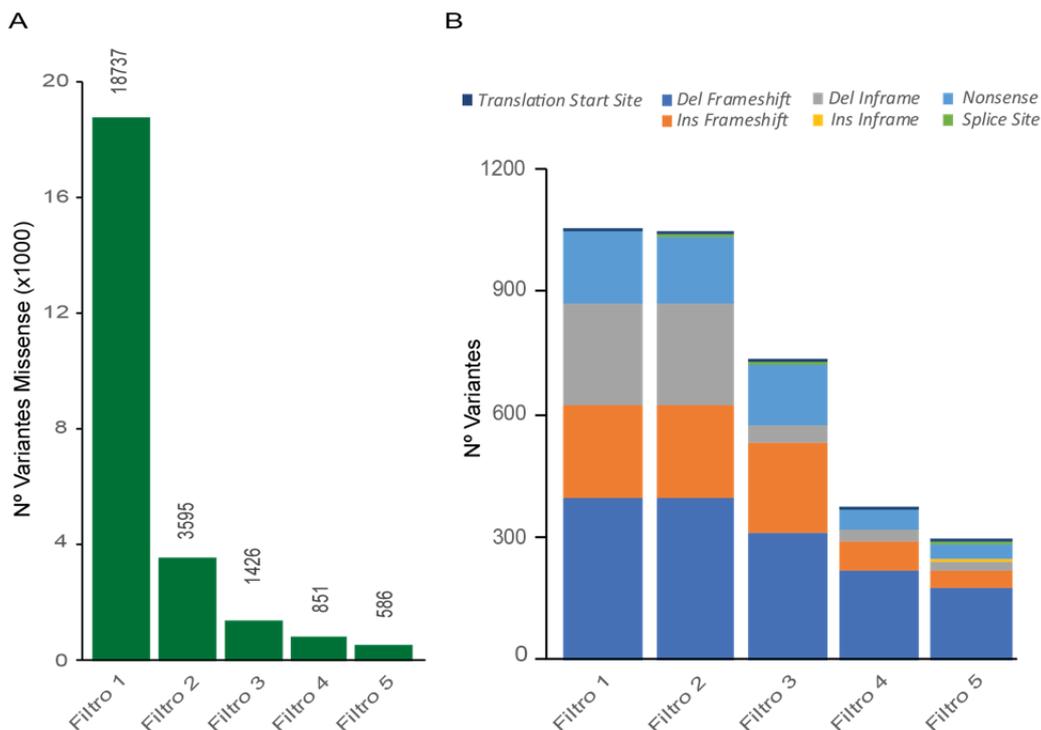
Deste modo, analisamos manualmente cada um dos 99 genes do painel. Para 13 genes encontramos sequências repetitivas (*tandem repeats* - TR) e/ou sequências longas de mais de 1000 bases com alta identidade em relação a outras regiões do genoma (duplicações). Variantes localizadas nestas regiões são pouco confiáveis já que possuem alta probabilidade de serem decorrentes de artefatos oriundos de captura e/ou mapeamento ambíguos, sendo assim erroneamente interpretadas como variantes. Deste modo, excluímos das análises todas as variantes exônicas localizadas em

regiões de TR ou em regiões de duplicação contidas nos genes alvo do painel (filtro 5).

A Tabela 1 descreve 11 genes com as respectivas coordenadas genômicas das regiões com TR ou duplicações mencionadas acima. Em outros dois genes, *KRAS* (duplicação na região chr12:25358175-25362843) e *IL2RG* (TR na região chrX:70327316-70327350), não foi necessário excluir as regiões duplicadas ou de TR porque nenhuma variante foi anotada em tais regiões, após a aplicação do filtro 4, nas coordenadas destes genes.

Decidimos excluir das análises de frequência mutacional todo o gene *HLA-B*. Localizado no braço curto do cromossomo 6, o *locus* de cerca de 4MB que compreende o gene *HLA* é considerado um dos mais variáveis do genoma humano, o que acarreta em variações individuais sendo interpretadas como variantes somáticas (WARREN et al. 2012). Após a aplicação dos 4 filtros de variantes descritos acima, identificamos 5 variantes distintas em *HLA-B* (todas não codificadoras), presentes em 24 amostras da coorte (FM: 22%). Dentre elas, a variante p.R180Qfs\*27 (rs766450595), cujo significado clínico ainda não foi descrito, aparece em 21 amostras. Essas variantes serão fruto de uma análise individualizada em separado em outro momento.

Assim, com a retirada das coordenadas referentes ao filtro 5, foram excluídos 43.640pb, o que equivale a 5,6% do painel, cuja amplitude de cobertura horizontal efetivamente avaliada equivale a 737.492pb. Nesse filtro, foram anotadas 850 variantes, com média 8 e mediana 4 variantes por amostra. A Figura 1 descreve os tipos e números de variantes anotadas em cada filtro. Todas as análises apresentadas doravante são oriundas da chamada com o filtro 5.



**Figura 1** - Contabilização e classificação de mutações de acordo com os filtros utilizados nas chamadas de variantes (painel).

Devido à grande predominância de variantes *missense*, os dados foram dispostos em gráficos separados para facilitar a visualização. (A) Contabilização de variantes *missense*. (B) Contabilização das demais variantes (inserções *frameshift* e *inframe*, deleções *frameshift* e *inframe*, *splice site* e *translation start site*). Filtro 1 excluiu variantes presentes em menos de 5 leituras, que não passaram pelos *hard filters* recomendados pelo GATK (filtros de qualidade de mapeamento, viés de posição e *strand bias*), variantes silenciosas, variantes intrônicas, intergênicas ou localizadas em alguma das UTRs (*untranslated regions*). Filtro 2 excluiu também as variantes com frequência superior a 1% no ExAC (*Exome Aggregation Consortium* - <http://exac.broadinstitute.org>). Filtro 3 também as variantes presentes no Arquivo Brasileiro Online de Mutações (ABraOM). Filtro 4 excluiu também as variantes presentes no *pool* de leucócitos de 16 casos da coorte. Filtro 5 excluiu também as variantes exônicas localizadas em regiões de TR (*tandem repeats*) ou em regiões com sequências longas duplicadas do DNA.

**Tabela 1** - Genes com sequências de bases repetidas (*tandem repeats*) e/ou segmentos duplicados.

Gene	Transcrito (pb)	CG (exclusão)	Bases excluídas
<b>ARHGAP5</b>	9.604	chr14: 32559706- 32563591 chr14: 32623825- 32625578	5.640
<b>ARHGAP21</b>	7.185	chr10:24872538-24875485 chr10: 24908402- 24910297	4.394
<b>FLG</b>	12.747	chr1:152275630-152286516	10.887
<b>IGF2BP3</b>	4.168	chr7:23349828-23352074 chr7: 23352351-23352468	2365
<b>IWS1</b>	3.000	chr2:128262558-128262944	387
<b>KMT2C</b>	16.872	chr7:151901285-152001246 chr7: 151832009-151834009	10969*
<b>MUC6</b>	8.003	chr11:1016550-1018563	2.013
<b>NF1</b>	12.444	chr17: 29527439-29588875	3.529 <sup>&amp;</sup>
<b>PIK3CA</b>	3.724	chr3:178935431-178939210	653 <sup>#</sup>
<b>PTEN</b>	5.572	chr10:89725039-89726314	1.276
<b>RPL22</b>	2.099	chr1:6245085-6246881	1.797

**Nota.** As variantes anotadas nessas regiões foram desconsideradas devido à possibilidade de erros de alinhamento e/ou contagem repetida de variantes. CG: Coordenada genômica (GRCH37); pb: pares de bases; \**KMT2C*: coordenadas incluem éxons 7 a 25 (não consideradas as regiões intrônicas na contagem de bases); <sup>&</sup>*NF1*: excluídos éxons 9-11, 13-29, 32-35 (não consideradas as regiões intrônicas na contagem de bases); <sup>#</sup> *PIK3CA* excluídos éxons 10 a 14 (não consideradas as regiões intrônicas na contagem de bases).

### 3.2.5 Exomas - Análise bioinformática e definição de filtros para chamada de variantes

Da mesma maneira como descrito no item 3.2.4 as sequências foram alinhadas ao genoma humano de referência GRCh37 utilizando a ferramenta BWA MEM (<http://arxiv.org/abs/1303.3997v2>). O pré-processamento das amostras foi realizado de acordo com as melhores práticas do GATK (*Genome Analysis Toolkit* - <https://software.broadinstitute.org/gatk/best-practices>), que inclui a remoção de duplicatas com a ferramenta Picard (<http://broadinstitute.github.io/picard/>), realinhamento de InDels (Inserções e Deleções) e re-calibração de escores de qualidade de base (BQSR - *Base Quality Score Recalibration*) (VAN DER AUWERA et al. 2013).

A chamada de variantes nas amostras com exoma completo sequenciado foi realizada utilizando a ferramenta MuTect2 do GATK. Variantes presentes em menos de 5 leituras e que não atenderam aos *hard filters* recomendados pelo GATK (filtros de qualidade de mapeamento, viés de posição e *strand bias*) foram desconsideradas. Variantes silenciosas, variantes em regiões intrônicas ou intergênicas e variantes localizadas nas UTRs (*untranslated regions*) também não foram contabilizadas no cálculo das frequências mutacionais.

Neste estudo, só dispusemos de DNA de leucócitos de 16 casos, portanto, não foi possível o pareamento individualizado de sequências de DNA tumoral e normal em todos os casos para a exclusão de variantes germinativas. Por esse motivo, utilizamos os filtros descritos a seguir para minimizar a probabilidade de inclusão de variantes germinativas nas análises realizadas.

Excluimos das análises todas as variantes presentes em mais de 1% das amostras da base de dados internacional ExAC (*Exome Aggregation Consortium*). Excluimos também as variantes presentes no Arquivo Brasileiro Online de Mutações (ABraOM) e por fim excluimos as variantes presentes no DNA do *pool* de leucócitos de 16 casos da coorte.

Após esses filtros, contabilizamos nos 24 casos da coorte 10.445 variantes em regiões codificadoras (RC; 895 deleções *frameshift*, 279

inserções *frameshift*, 48 deleções *inframe*, 142 inserções *inframe*, 8624 mutações *missense*, 282 *nonsense*, 7 *nonstop*, 152 *splice site* e 16 *translation start site*) e 4449 variantes sinônimas.

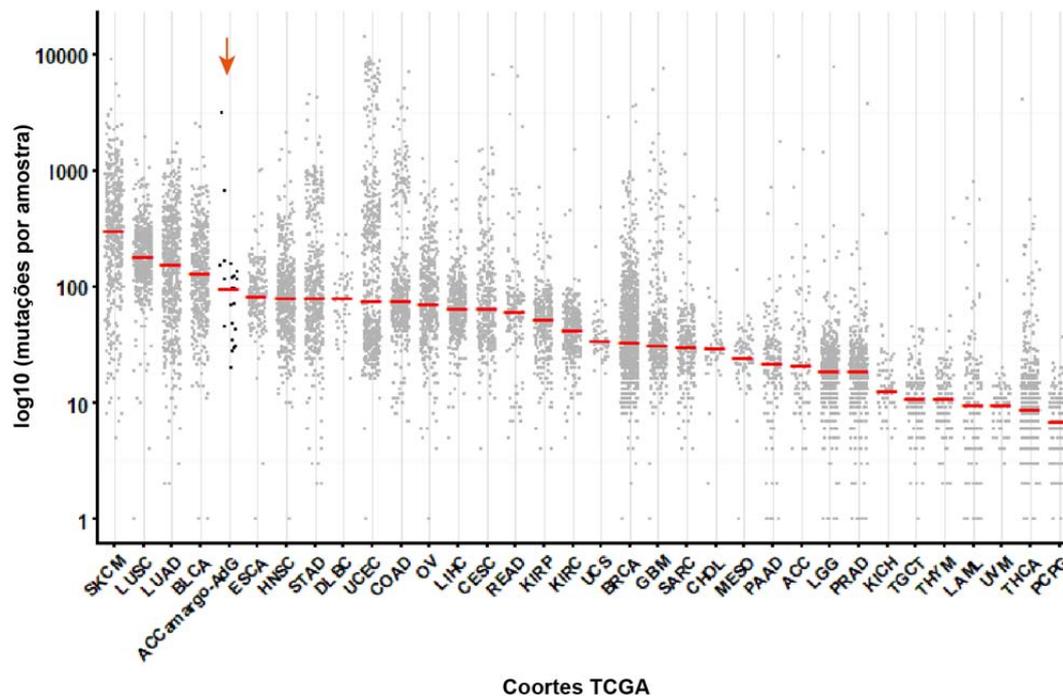
O elevado número de variantes anotadas sugere que os filtros estabelecidos não foram capazes de eliminar todas as variantes germinativas. Para comparação, Wang et al. (2011) encontraram 4653 variantes NS em RC em 22 exomas de AdG (WANG et al. 2011). Além disso, 10445 variantes NS posicionariam nossa coorte no segundo lugar em número de variantes por amostra entre dezenas coortes do TCGA (Figura 2), cinco posições acima da própria coorte de AdG do TCGA (STAD), cujas variantes foram anotadas com pareamento tumor/tecido normal.

Por fim, a frequência alélica (FA) média observada nessa chamada foi 0,39, o que também reforça a hipótese de que muitas das variantes anotadas são na realidade polimorfismos.

Por todos esses motivos, decidimos aplicar um filtro adicional para excluir variantes com FA maior que 0,35. Com esse filtro, a FA média caiu para 0,2 e foram anotadas 5723 variantes em RC (586 deleções *frameshift*, 164 inserções *frameshift*, 20 deleções *inframe*, 17 inserções *inframe*, 4639 mutações *missense*, 182 *nonsense*, 3 *nonstop*, 102 *splice site* e 10 *translation start site*) e 2030 variantes sinônimas.

### **3.2.6 Inferência de ancestralidade genômica**

Para inferência da ancestralidade genômica utilizamos um conjunto total de 120 mil SNPs indicativos de ancestralidade (MIA - marcadores informativos de ancestralidade), obtidos a partir de nove populações-referência conforme previamente publicado (ELHAIK et al. 2014). Esta parte do projeto teve a colaboração do Prof. Eran Elhaik (Universidade de Sheffield, UK) e da Dra Luiza Araújo (Lab. de Genômica Médica, CIPE, A.C. Camargo Cancer Center).

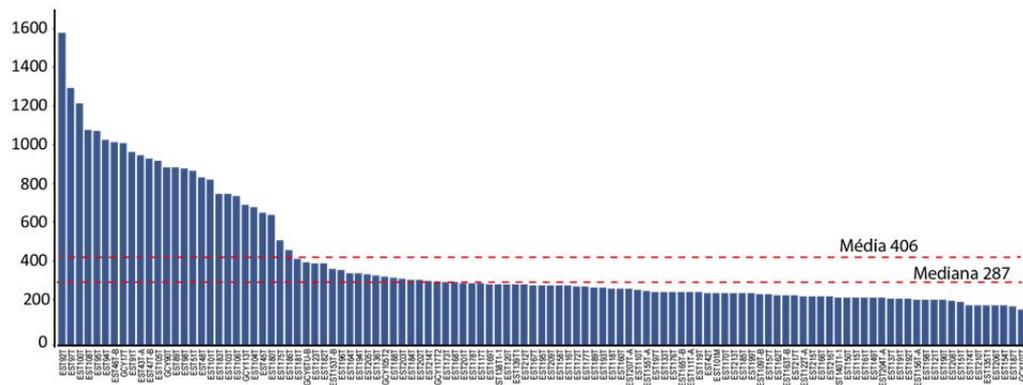


**Figura 2** - Carga mutacional dos tumores com exoma sequenciado (seta) em comparação a outras coortes do TCGA.

TCGA: *The Cancer Atlas Genome*; ACCamargo-AdG: coorte deste estudo; STAD: *stomach adenocarcinoma*

Para cada amostra, mapeamos as leituras *on-target* e *off-target* contra a sequência referência do genoma humano e verificamos se essas regiões cobriam as coordenadas exatas dos MIAs. A seguir, selecionamos os MIAs cobertos por três ou mais leituras e prosseguimos com a chamada de variantes utilizando o software GATK (*Genome Analysis Toolkit* - <https://software.broadinstitute.org/gatk/>). Assim, obtivemos uma média de 406 MIAs por amostra (Figura 3). Em seguida, unimos as informações de genótipos dos MIAs de cada amostra com os genótipos das nove populações referências (Mediterrâneo, Norte da Europa, Nordeste Asiático, Nativo Americano, Oceania, Sul da África, Sudeste Asiático, Sudoeste Asiático, África Subsaariana) utilizando o software Plink (PURCELL et al. 2007). Por fim, prosseguimos com as estimativas de ancestralidade utilizando o software Admixture usando o modo supervisionado (ALEXANDER et al. 2009).

Para simplificar as análises posteriores, agregamos as ancestralidades em 3 grupos: europeu (Mediterrâneo + Norte da Europa), asiático (Nordeste Asiático + Sudoeste Asiático + Sudeste Asiático + Nativo Americano) e africano (África Subsaariana + Sul da África).



**Figura 3** - Quantidade de marcadores informativos de ancestralidade por amostra (N=112).

### 3.2.7 Detecção do vírus de Epstein Barr nas amostras tumorais

Para avaliar a presença do vírus Epstein Barr (EBV) nas 112 amostras tumorais realizamos PCR em tempo real, com método multiplex. O DNA viral foi detectado por PCR com oligonucleotídeos específicos para a região BmH1W do EBV (F: 5'-GCAGCCGCCAGTCTCT-3'; R: 5'-ACAGACAGTGACAGGAGCCT-3'), para amplificar aproximadamente 84 pb do genoma de EBV, além de uma sonda marcada para aumentar a especificidade e gerar sinal fluorescente quantificável (FAM-AAAAGCTGGCGCCCTTGCCTG-TAMRA). Simultaneamente, no mesmo tubo de reação, amplificamos o gene humano  $\beta$ -actina (F: 5'-CCATCTACGAGGGGTATGC-3'; R: 5'-GGTGAGGATCTTCATGAGGTA-3'), com amplicons detectados em tempo real pela sonda marcada (VIC-CCTGCGTCTGGACCTGGCTG-NFQ). As reações foram realizadas no equipamento ABI 7500 Fast Real Time com ajuste padrão de ciclagem 95°C por 20 segundos, 95°C por 3 segundos e 60°C por 30 segundos, por 40 ciclos. Cada reação de 20  $\mu$ l continha: TaqMan® Fast Universal Master Mix

(2x) (Applied Biosystems®), oligonucleotídeos *forward* e *reverse* para cada sequência (oligonucleotídeo 18  $\mu$ M; sonda 5  $\mu$ M). Para verificar excluirmos contaminação, cada corrida continha ao menos dois controles negativos. Finalmente, a análise para a presença da infecção viral por EBV foi realizada calculando  $\Delta$ Ct, onde o Ct de EBV foi subtraído do Ct de  $\beta$ -actina, e o resultado calculado através da fórmula  $2^{(-\Delta Ct)}$ . As amostras foram consideradas positivas para EBV quando a razão EBV/ $\beta$ -actina era maior que 1. A detecção de EBV foi realizada para estas amostras pela doutoranda Irina Bobrovnitchaia, no CIPE/A.C. Camargo Cancer Center.

### 3.2.8 Definição da carga mutacional dos tumores (CMT)

Para avaliar a possível associação da CMT com o perfil mutacional dos tumores e com características clínicas e sobrevida dos indivíduos da coorte, definimos o *cutoff* para CMT alta através da fórmula usualmente utilizada para definição de *outliers* extremos:

$CMT_{cutoff} = Q3 + 3 \cdot IQR$ , onde Q3 é o 3º quartil e IQR é o intervalo interquartil ( $Q3 - Q1$ ). A partir dessa fórmula estabelecemos o valor de 19 variantes como *cutoff* para CMT alta e definimos a mediana (4) como limite superior para definição de CMT baixa. Os três grupos ficaram como a seguir:

CMT-A (alta):  $\geq 19$  variantes em RC

CMT-I (intermediária):  $4 < \text{variantes em RC} < 19$ .

CMT-B (baixa): variantes em RC  $< 4$

### 3.2.9 Base de dados do TCGA

Para analisar comparativamente nossos resultados com os dados do TCGA, baixamos os arquivos MAF (*Mutation Annotation Format*) diretamente do portal GDC (*Genomic Data Commons Data Portal*, <https://portal.gdc.cancer.gov>). A base de dados em AdG do TCGA utilizada neste estudo contém informações de 443 casos, 427 dos quais com pelo menos uma variante anotada.

As análises foram realizadas na base total, que contém variantes distribuídas em 15.917 genes, e também em um subgrupo incluindo apenas os mesmos 99 genes do painel de captura utilizado em nosso estudo.

### 3.2.10 Análises estatísticas

Para descrever as variáveis clínicas analisadas neste estudo utilizamos frequências absolutas e relativas. Para a análise de proporções entre os grupos foi utilizado o teste do qui-quadrado ou o teste exato de Fisher, quando apropriado. A comparação da média de idade entre grupos foi feita pelo teste *t* de Student.

Para avaliar a associação entre genes e variáveis clínicas dicotômicas, foi utilizado teste exato de Fisher com correção para múltiplas análises pelo método de Benjamini-Hochberg (BH). Neste trabalho, o  $p$  ajustado pela metodologia de BH está referido como FDR (*false discovery rate*). Para a avaliação da associação entre genes e variáveis com mais de um grau de liberdade, foram realizadas comparações entre pares (*pairwise* - um contra um) e entre grupos (*groupwise* - um contra todos) utilizando teste exato de Fisher com correção para múltiplas análises pelo método BH.

Para a comparação de distribuição das mutações entre os grupos foi utilizado o teste U de Mann-Whitney com correção para múltiplas análises pelo método BH.

Sobrevida global foi definida como o tempo transcorrido desde a data do diagnóstico até o óbito do paciente por qualquer causa. Sobrevida livre de doença foi definida como o tempo transcorrido desde a cirurgia até a data da recidiva ou o óbito do paciente por qualquer causa. As análises de sobrevida foram realizadas pelo método de Kaplan-Meier e a diferença entre as curvas foi calculada pelo teste de log-rank. O tempo de seguimento foi calculado pelo método de Kaplan-Meier reverso.

A análise de fatores prognósticos foi realizada através do modelo de risco proporcional de Cox. Foi utilizado o modelo multivariado com as seguintes variáveis definidas como entrada forçada: tipo histológico (intestinal x difuso), localização (TEG x distal) e estadiamento ao diagnóstico (I, II, III, IV).

Os resultados das análises foram considerados estatisticamente significantes quando o p-valor em testes bicaudais foi inferior a 0,05.

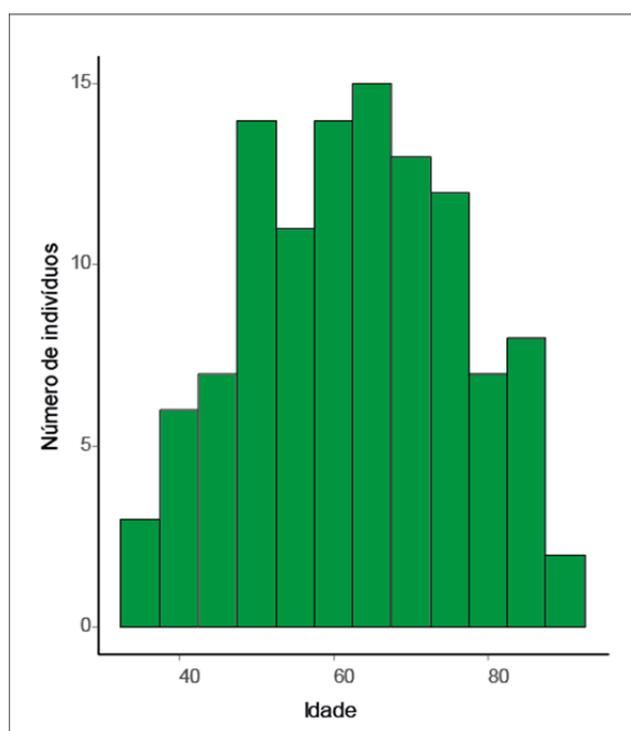
As análises estatísticas deste estudo foram realizadas no software RStudio (RSTUDIO TEAM 2015). Além das ferramentas de base do R, foram utilizados os seguintes pacotes: *gmodels*, *survminer*, *digest*, *survival*, *dplyr*, *data.table*, *maftools*, *ggplot2*, *car*, *rcompanion*.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

A coorte de estudo foi composta por 112 casos diagnosticados entre dezembro de 2001 e janeiro de 2012. As principais características clínicas dos casos podem ser observadas na Tabela 2.

A idade dos pacientes variou entre 37 e 91 anos, com mediana de 64 anos. A Figura 4 demonstra a distribuição de idade dos casos da coorte. A maioria deles é do sexo masculino (63%), com uma razão homem/mulher 1,73.



**Figura 4** - Distribuição dos casos de AdG deste estudo, de acordo com a faixa etária ao diagnóstico.

Quanto ao estadiamento patológico, os casos distribuíram-se da seguinte maneira: estágio clínico (EC) I 22,3%, EC II 20,5%, EC III 42,9%, EC IV 14,3% (Tabela 2).

Todos os casos da coorte, à exceção de 1, foram submetidos a cirurgia do tumor primário. Apenas 5 casos foram positivos para EBV (4,5%) (Tabela 2).

**Tabela 2** - Características clínicas dos 112 casos da coorte.

		N (%)
<b>Sexo</b>	<b>M</b>	71 (63)
	<b>F</b>	41 (37)
<b>Idade (anos)</b>	<b>Mediana</b>	64
	<b>Mín-Máx</b>	(37-91)
<b>Localização</b>	<b>TEG</b>	13 (11,6)
	<b>Corpo</b>	56 (50)
	<b>Antro</b>	34 (30,4)
	<b>Linite</b>	7 (6,2)
	<b>Coto gástrico</b>	2 (1,8)
<b>Histologia (OMS)</b>	<b>AdG SOE</b>	59 (52,7)
	<b>AdG-SI</b>	30 (26,8)
	<b>AdG-P</b>	1 (0,9)
	<b>AdG-T</b>	12 (10,7)
	<b>CPD</b>	10 (8,9)
<b>Lauren</b>	<b>Intestinal</b>	46 (41,1)
	<b>Difuso</b>	53 (47,3)
	<b>Misto</b>	3 (2,7)
	<b>Inclassificável</b>	10 (8,9)
<b>Cirurgia do primário</b>	<b>Sim</b>	111 (99,1)
	<b>Não</b>	1 (0,9)
<b>Estadiamento (AJCC 7<sup>a</sup> Ed.)</b>	<b>IA</b>	17 (15,2)
	<b>IB</b>	8 (7,1)
	<b>IIA</b>	12 (10,7)
	<b>IIB</b>	11 (9,8)
	<b>IIIA</b>	12 (10,7)
	<b>IIIB</b>	17 (15,2)
	<b>IIIC</b>	19 (17)
	<b>IV</b>	16 (14,3)
<b>EBV</b>	<b>Negativo</b>	107 (95,5)
	<b>Positivo</b>	5 (4,5)

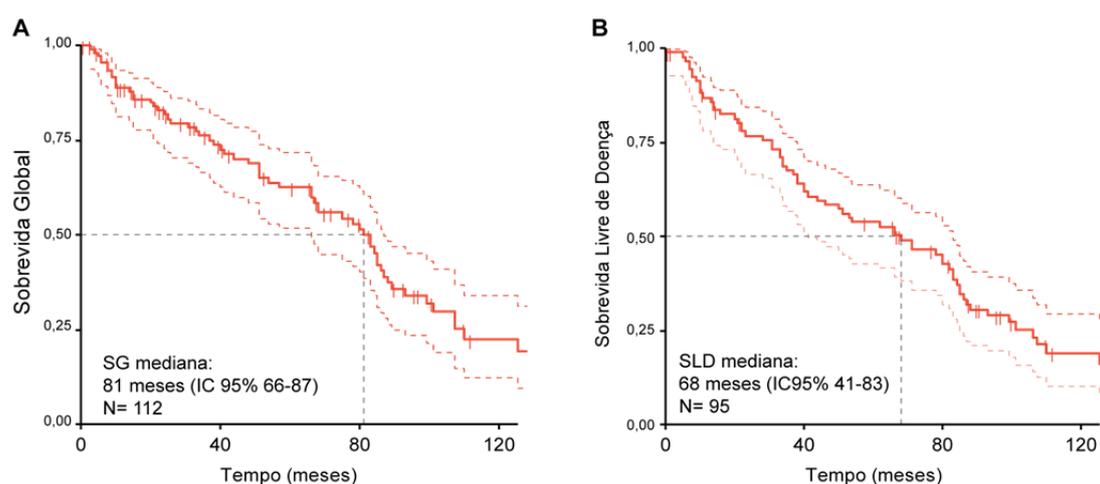
**Nota.** TEG: transição esôfago-gástrica; Inclassificável: não classificado pela classificação de Lauren. AdG-SOE: adenocarcinoma sem outras especificações; AdG-SI: adenocarcinoma em anel de sinete; AdG-P adenocarcinoma papilífero; AdG-T: adenocarcinoma tubular; CPD: carcinoma pouco diferenciado; EBV: Epstein Barr Virus.

Os casos desta coorte não foram analisados quanto à imunoeexpressão tecidual de Her2, que só passou a ser realizada amplamente na rotina do nosso serviço a partir de 2013.

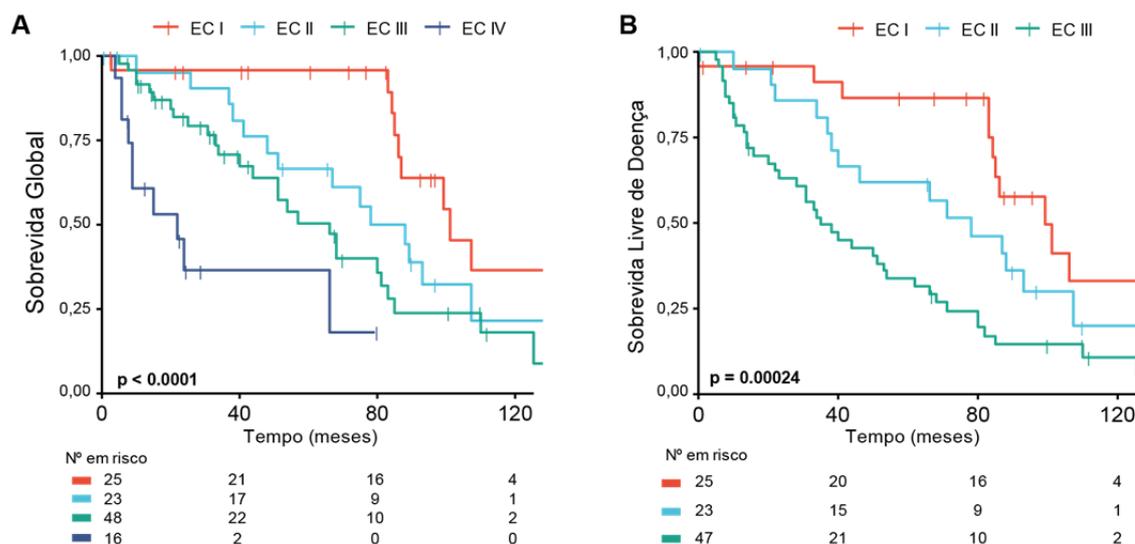
#### 4.1.1 Sobrevida global e sobrevida livre de doença (coorte total)

O tempo mediano de seguimento dos pacientes foi 95 meses (IC95% 76-109), com SG mediana 81 meses (IC95% 66-87) (Figura 5). A mediana de sobrevida dos casos com EC I foi 101 meses (IC95% 87-NA) e dos casos com EC II foi 83 meses (IC95% 51-NA). Os casos com EC III apresentaram sobrevida mediana de 66 meses (IC95% 51-85) e naqueles com EC IV a mediana de sobrevida foi 22 meses (IC95% 9-NA) (Figura 6).

A mediana de SLD analisando os estádios I, II e III agregados foi 68 meses (IC95% 41-83) (Figura 5). Nos casos com EC IA, mediana de SLD foi 99 meses (IC95% 83-NA) e naqueles com EC II a mediana observada foi 78 meses (IC95% 38-107). Já nos casos com EC III, a mediana de SLD foi 35 meses (IC95% 22-53) (Figura 6). A Tabela 3 resume a probabilidade de sobrevida livre de recorrência em 1 ano, 2 anos e 5 anos para os estádios I a III, calculada pelo método de Kaplan-Meier.



**Figura 5** - Curvas de sobrevida global e sobrevida livre de doença da coorte inteira.



**Figura 6** - Curvas de sobrevida global e sobrevida livre de doença de acordo com o estadiamento ao diagnóstico.

**Tabela 3** - Sobrevida livre de doença em 1, 2 e 5 anos.

	SLD 1a (IC95%)	SLD 2a (IC95%)	SLD 5a (IC95%)
EC I	96% (75-99)	96% (75-99)	87% (65-96)
EC II	95% (71-99)	86% (62-95)	62% (38-79)
EC III	78% (63-88)	62% (46-75)	32% (19-46)

**Nota.** SLD: Sobrevida livre de doença; EC: estágio clínico.

#### 4.1.2 Sexo

As principais características clínicas avaliadas não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os sexos. A mediana de idade ao diagnóstico foi 65 anos (37-91) entre os homens e 62 anos (37-85), entre as mulheres ( $p=0,47$ ). Não houve diferenças relevantes na localização dos tumores ( $p=0,32$ ), subtipo de Lauren ( $p=0,45$ ), estadiamento ( $p=0,7$ ) ou *status* de EBV ( $p=0,21$ ).

Não observamos nenhuma associação entre sexo e sobrevida dos pacientes. A SG mediana dos homens foi 81 meses (IC95% 66-89) e das mulheres foi 85 meses (IC95% 57-NA), com  $p=0,6$ . Da mesma maneira, a variável sexo não influenciou na SLD. Embora a SLD mediana nos homens tenha sido numericamente inferior (66 meses; IC95% 38-83) do que nas

mulheres (78 meses; IC95% 37-93), não houve diferença estatística  $p=0,47$  (Figura 7). No modelo de regressão de Cox, incluindo as variáveis estágio clínico, Lauren e localização do tumor, a variável sexo também não se mostrou associada à SLD de maneira independente ( $p=0,14$ ).

#### 4.1.3 Idade ao diagnóstico (<50 anos x ≥50 anos)

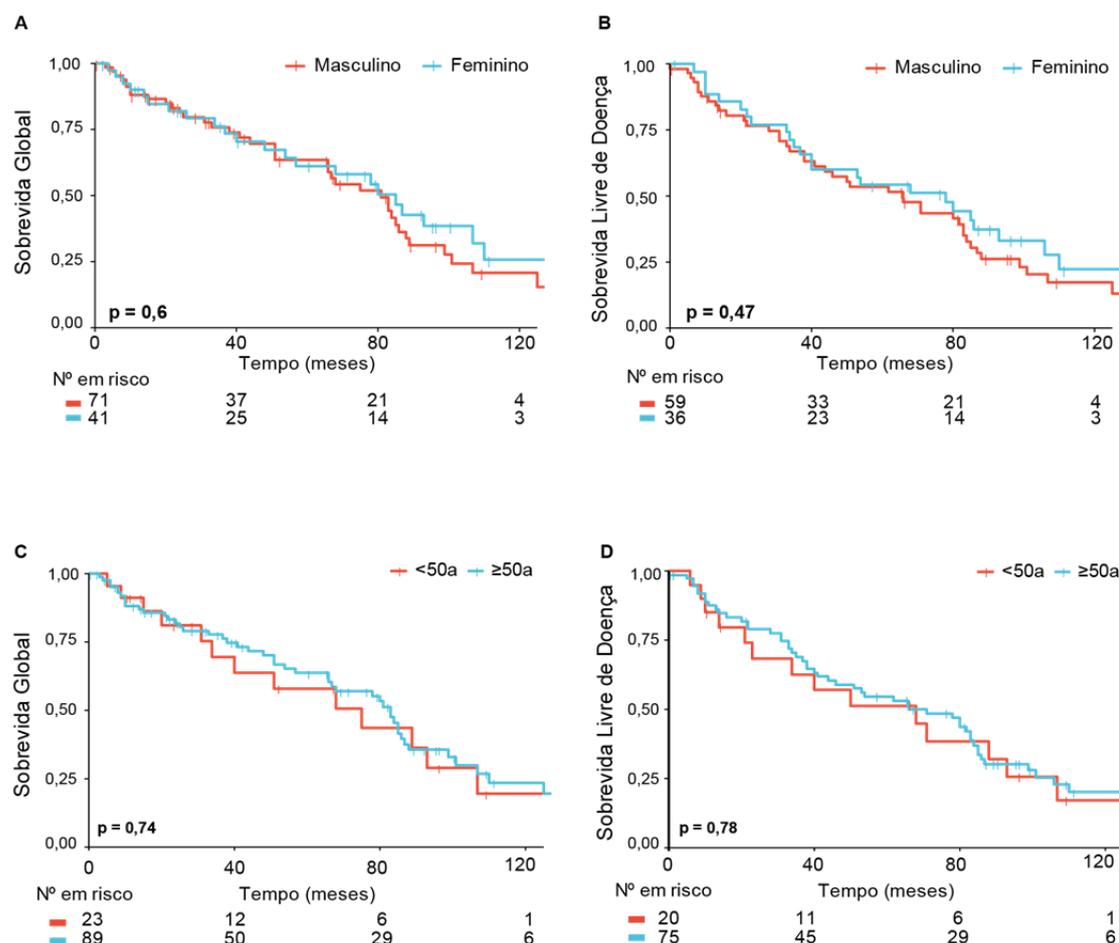
A média de idade dos casos estudados nessa coorte foi 62,7 anos e o desvio padrão (DP) foi 13,6. Para selecionar um grupo de pacientes com diagnóstico de AdG em idade mais jovem, definimos o *cutoff* de 49 anos a partir da equação (Média -1DP). O grupo com idade <50 anos ficou com 23 casos e o grupo com idade ≥50 anos ficou com 89 casos.

Identificamos uma forte associação entre idade ao diagnóstico e subtipo de Lauren ( $p=0,002$ ). Dos casos abaixo de 50 anos, 60,9% (14/23) foram AdG-D e apenas 13% (3/23) foram AdG-I. De maneira análoga, observamos uma associação entre o tipo histológico (OMS) e a idade ao diagnóstico ( $p=0,017$ ). Mais da metade dos tumores em pacientes mais jovens (12/23; 52,2%) eram AdG-SI e 39,1% (9/23) eram AdG-SOE. Digno de nota, 40% (12/30) dos tumores descritos como AdG-SI ocorreram em pacientes abaixo de 50 anos.

Na coorte deste estudo também encontramos uma associação entre idade ao diagnóstico e estadiamento ( $p=0,004$ ). Quase todos os casos mais jovens apresentaram doença localmente avançada, com 91,3% deles distribuindo-se entre os estádios II (30,4%) e III (60,9%). Apenas dois casos (8,7%) abaixo de 50 anos apresentaram doença metastática ao diagnóstico e nenhum apresentou estágio I. Já os casos acima de 50 anos distribuíram-se em todos os estádios (EC I 28,1%; EC II 18%; EC III 38,2% e EC IV 15,7%).

Apesar da predominância de doença mais avançada entre os pacientes mais jovens, não observamos diferenças em SG ou SLD entre os dois grupos etários. A SG mediana observada nos casos abaixo de 50 anos foi 75 meses (IC95% 40-NA) e naqueles acima de 50 anos foi 83 meses (IC95% 66-99), com HR 1,11 (IC95% 0,6-2,05;  $p=0,74$ ). Por sua vez, a SLD

mediana nos pacientes mais jovens foi 68 meses (IC95% 34-NA) e 71 meses (IC95% 44-85) nos casos acima de 50 anos, sem significância estatística (HR 1,09; IC 0,6-1,96;  $p=0,78$ ) (Figura 7).



**Figura 7** - Curvas de sobrevida global e sobrevida livre de doença de acordo com o sexo e a idade dos pacientes (<50 anos x ≥50 anos).

#### 4.1.4 Localização do tumor

Metade dos tumores nesta coorte estava localizada no corpo gástrico e 30,4% no antro. Os tumores proximais localizados na transição esôfago-gástrica (TEG) representaram 11,6% (13/112) e aqueles que se manifestaram na forma de linite gástrica representaram 6,2% (7/112) dos casos. Dois pacientes (1,8%) apresentaram tumores no coto gástrico de gastrectomia prévia por doença benigna (Tabela 2).

Comparando os tumores localizados na TEG com os tumores distais, não observamos diferenças relevantes quanto à distribuição por sexo ( $p=0,65$ ), idade ( $p=0,4$ ), histologia de acordo com a OMS ( $p=0,78$ ), estadiamento ( $p=0,42$ ) e positividade para EBV ( $p=0,19$ ). Contudo, observamos uma associação entre a localização do tumor (TEG x distal) e o subtipo de Lauren ( $p=0,02$ ). Entre os tumores de TEG observamos uma maior proporção de AdG-I (69,2%) e AdG-INC (15,4%) do que de AdG-D (7,7%)(Tabela 4).

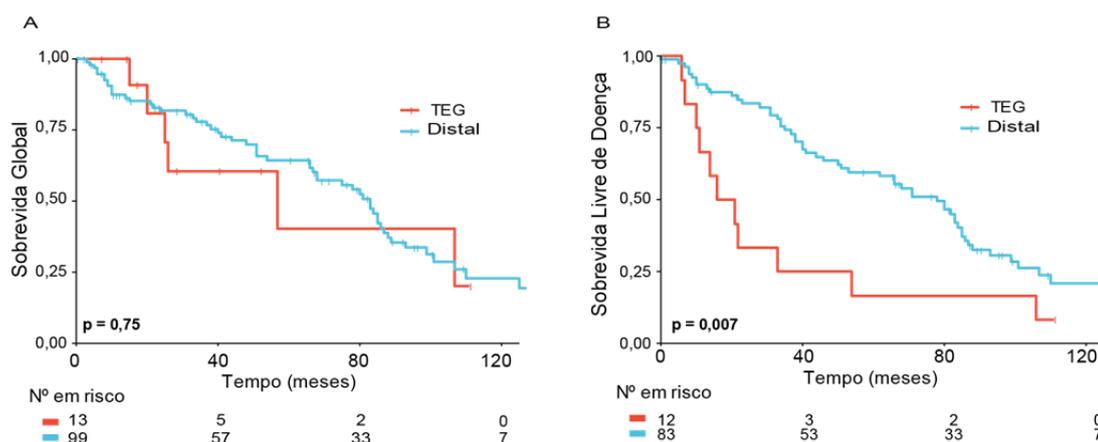
A mediana de SG entre os 13 casos com AdG em TEG foi 57 meses (IC95% 25-NA). Embora esse valor seja bastante inferior ao observado nos 99 casos distais (83 meses; IC95% 68-89), a diferença não foi estatisticamente significativa (HR 1,15; IC95% 0,49-2,7;  $p=0,7$ ) (Figura 8). No modelo de regressão de Cox, incluindo as variáveis estágio clínico e Lauren, a localização do tumor (TEG x Distal) também não se mostrou associada à SG de maneira independente ( $p=0,64$ ).

Entretanto, detectamos que a localização do tumor (TEG x Distal) esteve associada à SLD nessa coorte. A SLD mediana aferida nos tumores de TEG foi 18,5 meses (IC95% 11-NA) contra 78 meses (IC95% 53-86) nos tumores distais (HR 2,4; IC95% 1,24-4,62;  $p=0,007$ ) (Figura 8).

**Tabela 4** - Características clínicas dos casos segundo a localização do tumor (TEG x Distal).

		TEG (n=13) N (%)	Distal (n=99) N (%)	<i>p</i>
<b>Sexo</b>	<b>M</b>	7 (53,8)	64 (64,6)	0,65
	<b>F</b>	6 (46,2)	35 (35,4)	
<b>Idade (anos)</b>	<b>Média</b>	60	63	0,4
	<b>Mediana</b>	57	65	
	<b>Mín-Máx</b>	42-84	37-91	
<b>Histologia (OMS)</b>	<b>AdG-SOE</b>	9 (69,2)	50 (50,5)	0,78
	<b>AdG-SI</b>	2 (15,4)	28 (28,3)	
	<b>AdG-P</b>	0 (0)	1 (1,0)	
	<b>AdG-T</b>	1 (7,7)	11 (11,1)	
	<b>CPD</b>	1 (7,7)	9 (9,1)	
<b>Lauren</b>	<b>Intestinal</b>	9 (69,2)	37 (37,4)	0,02*
	<b>Difuso</b>	1 (7,7)	52 (52,5)	
	<b>Misto</b>	1 (7,7)	2 (2,0)	
	<b>Inclassificável</b>	2 (15,4)	8 (8,1)	
<b>Estadiamento (AJCC 7ª Ed.)</b>	<b>IA</b>	1 (7,7)	16 (16,2)	0,42
	<b>IB</b>	1 (7,7)	7 (7,1)	
	<b>IIA</b>	2 (15,4)	10 (10,1)	
	<b>IIB</b>	0 (0)	11 (11,1)	
	<b>IIIA</b>	3 (23)	9 (9,1)	
	<b>IIIB</b>	1 (7,7)	16 (16,2)	
	<b>IIIC</b>	4 (30,8)	15 (15,1)	
	<b>IV</b>	1 (7,7)	15 (15,1)	
<b>EBV</b>	<b>Negativo</b>	11 (84,6)	96 (97)	0,19
	<b>Positivo</b>	2 (15,4)	3 (3)	

**Nota.** TEG: transição esôfago-gástrica; AdG-SOE: adenocarcinoma sem outras especificações; AdG-SI: adenocarcinoma em anel de sinete; AdG-P adenocarcinoma papilífero; AdG-T: adenocarcinoma tubular; CPD: carcinoma pouco diferenciado; EBV: Epstein Barr Virus.

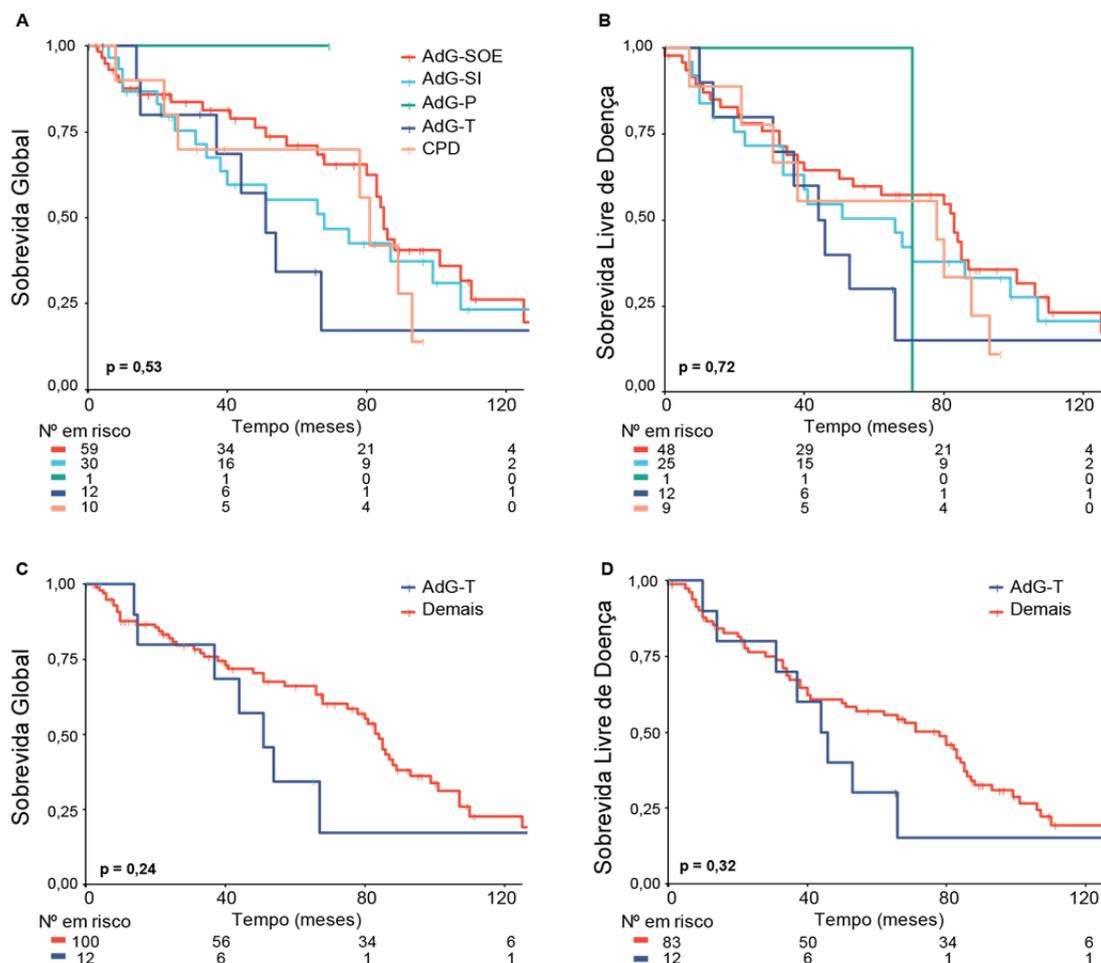


**Figura 8** - Curvas de sobrevida global e sobrevida livre de doença de acordo com a localização do tumor (TEG x Distal).

#### 4.1.5 Tipo histológico dos tumores (OMS)

De acordo com a classificação histológica da Organização Mundial da Saúde (OMS), metade da nossa coorte (52,7%) tinha adenocarcinoma sem outras especificações (AdG-SOE) e 26,7% tinha adenocarcinoma com células em anel de sinete. Os demais casos dividiram-se entre os seguintes tipos histológicos: adenocarcinoma tubular (AdG-T: 10,7%), carcinoma pouco diferenciado (CPD: 8,9%) e adenocarcinoma papilífero (AdG-P: 0,9%) (Tabela 2).

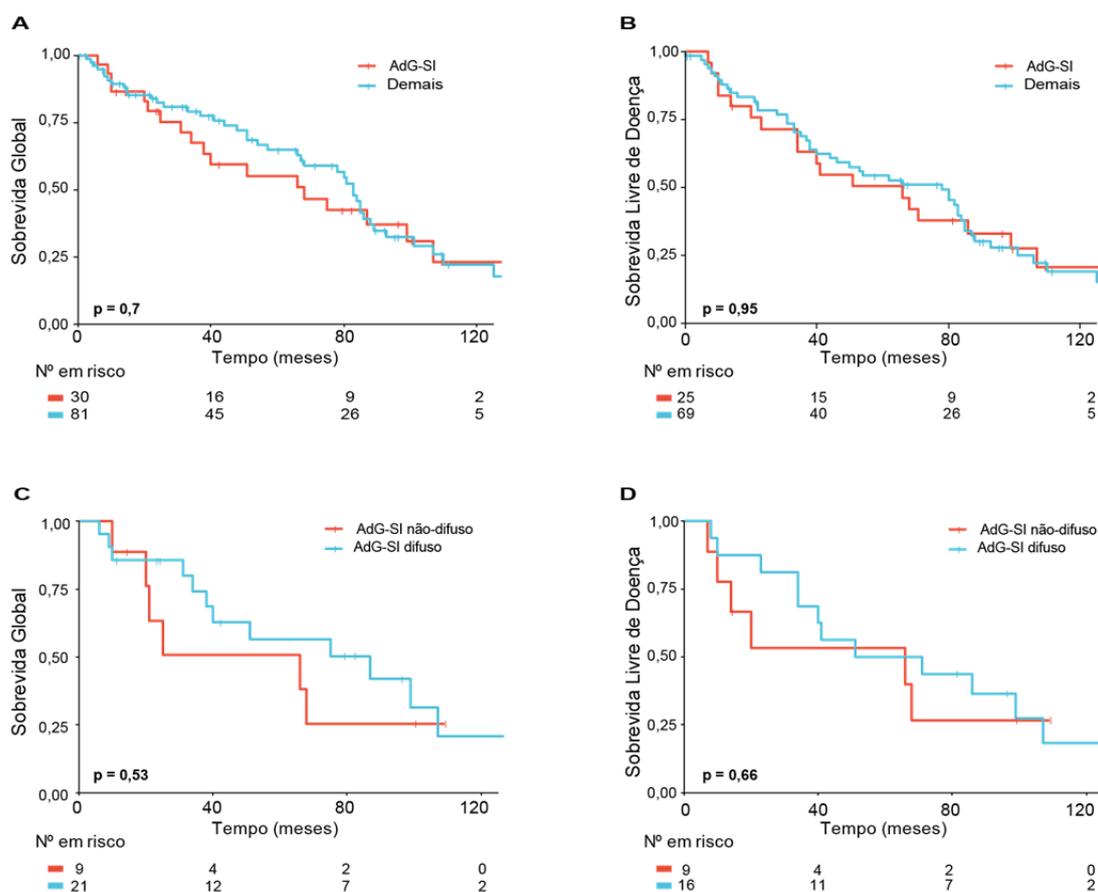
Não observamos diferenças de sobrevida estatisticamente significativas de acordo com a classificação da OMS (Figura 9A e B). No entanto, a despeito de não haver casos metastáticos entre os AdG-T, os pacientes com esse tipo de tumor apresentaram a menor sobrevida dentre todos os subtipos histológicos (OMS). A SG mediana nos casos com histologia tubular foi 51 meses (IC95% 37-NA) em comparação a 84 meses (IC95% 75-99). Essa diferença não foi estatisticamente significativa (HR 1,6; IC95% 0,72-3,54; p=0,2), possivelmente devido ao reduzido número de pacientes em risco no grupo com AdG-T (n=12). De maneira semelhante, a SLD nos casos com AdG-T foi inferior aos demais casos. A mediana de SLD foi 45 meses nos AdG-T (IC95% 31-NA) e 78 meses nos demais casos (IC95% 50-85). Essa diferença também não atingiu significância estatística (HR 1,46; IC95% 0,69-3,09; p=0,3) (Figura 9C e D).



**Figura 9** - Sobrevida de acordo com o tipo histológico (OMS).

AdG-SOE: adenocarcinoma sem outras especificações. AdG-SI: adenocarcinoma em anel de sinete. AdG-P: adenocarcinoma papilífero. AdG-T: adenocarcinoma tubular. CPD: carcinoma pouco diferenciado.

Segundo a classificação da OMS, o AdG-SI inclui-se entre os carcinomas pouco coesos e correlaciona-se usualmente ao tipo difuso de Lauren. A coorte estudada contém 30 casos de AdG com componente em anel de sinete, 21 dos quais foram descritos como tipo difuso de Lauren. Outros 5 AdG-SI foram descritos como tipo intestinal e 4 foram descritos como inclassificáveis pela classificação de Lauren. Os casos com AdG-SI classificados como Lauren não-difuso apresentaram sobrevida numericamente menor do que os indivíduos com AdG-SI difusos, embora sem significância estatística (66 meses x 87 meses, respectivamente; HR 0,73; IC95% 0,27-1,96;  $p=0,5$ ) (Figura 10).



**Figura 10** - Curvas de sobrevida nos adenocarcinomas em anel de sinete.

SG (A) e SLD (B) nos AdG-SI em comparação aos demais casos. SG (C) e SLD (D) dos AdG-SI difusos x não-difusos. SG: sobrevida global; SLD: sobrevida livre de doença; AdG-SI: adenocarcinoma em anel de sinete.

#### 4.1.6 Tipo histológico dos tumores (Lauren)

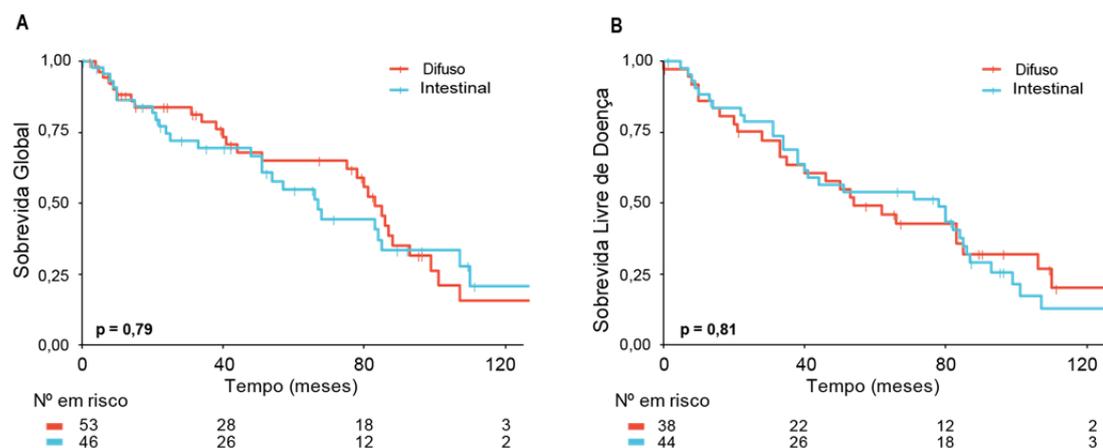
Ainda a respeito dos tipos histológicos, de acordo com a classificação de Lauren, a maior parte dos casos apresentava subtipo difuso (AdG-D 47,3%), com o subtipo intestinal (AdG-I) respondendo por 41,1% dos casos. Três casos (2,7%) foram classificados como mistos (AdG-M) e outros 10 casos (8,9%) foram considerados inclassificáveis (AdG-INC).

Comparando os AdG-I com os AdG-D, não observamos diferenças estatisticamente significativas quanto à distribuição por sexo ( $p=0,36$ ), estadiamento ( $p=0,98$ ) e positividade para EBV ( $p=0,71$ ). No entanto, como já mencionado, observamos uma associação entre o subtipo de Lauren e a idade ao diagnóstico ( $p=0,0003$ ). Os AdG-D foram diagnosticados em pacientes mais jovens (Média: AdG-I 69 anos; AdG-D 60 anos;  $p=0,0002$ ).

Além disso, observamos uma forte associação entre o subtipo de Lauren e a localização do tumor ( $p=0,0007$ ). Os AdG-D localizam-se mais distalmente, com apenas 1 deles tendo sido diagnosticado na TEG (1/53; 1,9%). Além disso, como era de se esperar, os AdG-I não se manifestam na forma de linite (0/46) (Tabela 5).

Na coorte estudada também não encontramos associação entre subtipo de Lauren e SG ( $p=0,57$ ) ou SLD ( $p=0,88$ ). De maneira curiosa, a mediana de SG nos AdG-D (83 meses; IC95% 75-99) foi numericamente maior do que nos AdG-I (67 meses; IC95% 51-110), mas essa diferença não foi estatisticamente significativa (HR 0,92; IC95% 0,54-1,59;  $p=0,79$ ) (Figura 11).

A SLD mediana também foi numericamente maior nos AdG-D (78 meses; IC95% 40-87) em relação aos AdG-I (54 meses; IC95% 35-106), também sem significância estatística (HR 1,06; IC95% 0,63-1,8).



**Figura 11** - Curvas de sobrevida global e sobrevida livre de doença de acordo com a classificação de Lauren (Intestinal x Difuso).

**Tabela 5.** Características clínicas dos casos segundo a classificação de Lauren (Intestinal x Difuso).

		AdG-I (n=46) N (%)	AdG-D (n=53) N (%)	<i>p</i>
<b>Sexo</b>				
	<b>M</b>	31 (67,4)	31 (58,5)	0,36
	<b>F</b>	15 (32,6)	22 (41,5)	
<b>Idade (anos)</b>				
	<b>Média</b>	69	60	0,0002*
	<b>Mediana</b>	69	58	
	<b>Mín-Máx</b>	42-91	37-88	
<b>Localização</b>				
	<b>TEG</b>	9 (19,6)	1 (1,9)	0,0007*
	<b>Corpo</b>	17 (37)	32 (60,4)	
	<b>Antro</b>	20 (43,4)	13 (24,5)	
	<b>Linite</b>	0 (0)	6 (11,3)	
	<b>Coto gástrico</b>	0 (0)	1 (1,9)	
<b>Histologia (OMS)</b>				
	<b>AdG-SOE</b>	31 (67,4)	23 (43,4)	0,0019*
	<b>AdG-SI</b>	5 (10,9)	21 (39,6)	
	<b>AdG-T</b>	8 (17,4)	3 (5,7)	
	<b>CPD</b>	2 (4,3)	6 (11,3)	
<b>Estadiamento (AJCC 7<sup>a</sup> Ed.)</b>				
	<b>IA</b>	8 (17,4)	9 (17)	0,98
	<b>IB</b>	4 (8,7)	4 (7,5)	
	<b>IIA</b>	4 (8,7)	4 (7,5)	
	<b>IIB</b>	4 (8,7)	4 (7,5)	
	<b>IIIA</b>	6 (13)	5 (9,4)	
	<b>IIIB</b>	3 (6,5)	4 (7,5)	
	<b>IIIC</b>	5 (10,9)	10 (18,9)	
	<b>IV</b>	8 (17,4)	9 (17)	
		8 (17,4)	8 (15,1)	
<b>EBV</b>				
	<b>Negativo</b>	45 (97,8)	50 (94,3)	0,71
	<b>Positivo</b>	1 (2,2)	3 (5,7)	

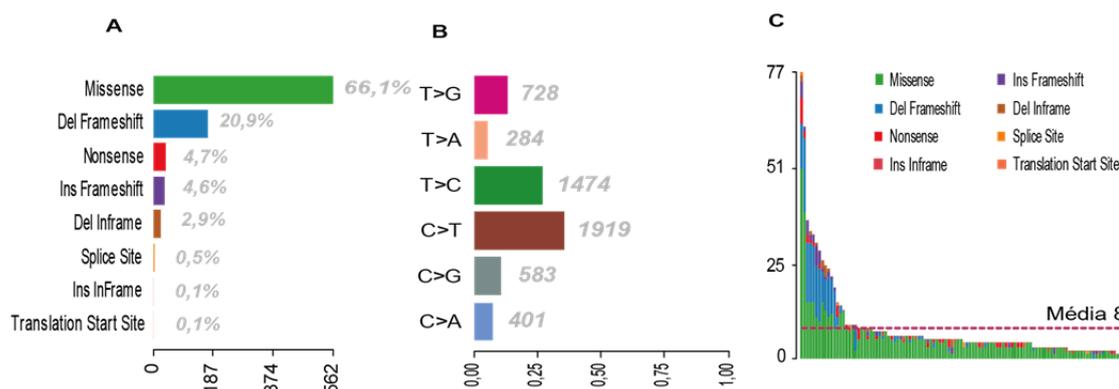
**Nota:** TEG: transição esôfago-gástrica; AdG-SOE: adenocarcinoma sem outras especificações; AdG-SI: adenocarcinoma em anel de sinete; AdG-P adenocarcinoma papilífero; AdG-T: adenocarcinoma tubular; CPD: carcinoma pouco diferenciado; EBV: Epstein Barr Virus.

Essa relação inverteu-se quando avaliamos apenas os casos metastáticos. Nesse subgrupo (n=16, 8 AdG-D e 8 AdG-I), a SG dos AdG-I (23 meses; IC95% 9-NA) foi maior que a dos AdG-D (15 meses; IC95% 9-NA). Provavelmente devido ao reduzido número de casos metastáticos, essa diferença não atingiu significância estatística (HR 0,88; IC95% 0,24-3,14; p=0,8).

## 4.2 PERFIL MUTACIONAL DOS TUMORES (PMT)

No sequenciamento do painel gênico customizado, realizado para 112 amostras, atingimos uma cobertura média de 706x, com 95% das bases atingindo cobertura mínima de 100x. Após a aplicação dos filtros descritos, contabilizamos 850 variantes NS em RC e outras 225 variantes sinônimas. A relação mutações não sinônimas/sinônimas (NS/S) foi 3,77. A relação NS/S é usada para estimar a pressão seletiva sob certas regiões genômicas, onde NS/S >1 indica uma seleção positiva (HURST 2002). As mutações em regiões codificadoras distribuíram-se em 94 genes, portanto, não foram anotadas variantes em apenas 4 dos 99 genes (*DNAH7*, *ARHGAP21*, *ARHGAP5* e *NAA25*). Além disso, conforme explicado no item 2.1, as variantes anotadas em *HLA-B* não foram contabilizadas nas análises apresentadas neste trabalho.

Os tumores estudados apresentaram uma média de 8 mutações somáticas. Considerando a amplitude final de captura do painel (737.492 pb), os tumores apresentaram em média 11 Mut/Mb. A maioria das variantes observadas foram mutações pontuais (*single nucleotide variant* - SNV) do tipo *missense*, representando 66,1% do total de variantes em RC. C>T foi a troca de nucleotídeos mais comumente observada (35,6%), seguida por T>C (27,4%) e T>G (13,5%), caracterizando uma predominância de transições (63%) sobre transversões (37%) (Figura 12).



**Figura 12** - Classificação das variantes e número de variantes por amostra.

(A) Tipos de variantes; (B) Trocas de nucleotídeos mais frequentemente observadas; (C) Número de variantes por amostra.

Os dez genes do painel mais frequentemente mutados em nossa coorte foram *TP53* (30%), *LAMA1* (21%), *ARID1A* (19%), *CIC* (19%), *FAT4* (17%), *PKHD1* (16%), *KMT2C* (15%), *MACF1* (15%), *PKHDL1* (15%) e *BRCA2* (14%). Na Figura 13 podem ser observados os 30 genes mais mutados na coorte.

A Figura 14 mostra os 10 genes mais mutados na coorte em comparação ao observado em uma análise do TCGA com apenas os 99 genes do painel de captura usado neste estudo. Observamos uma maior média de mutações por tumor em nossa coorte (8 x 5) e uma coincidência de 5 genes entre os 10 mais mutados (*TP53*, *ARID1A*, *LAMA1*, *FAT4* e *KMT2C*).

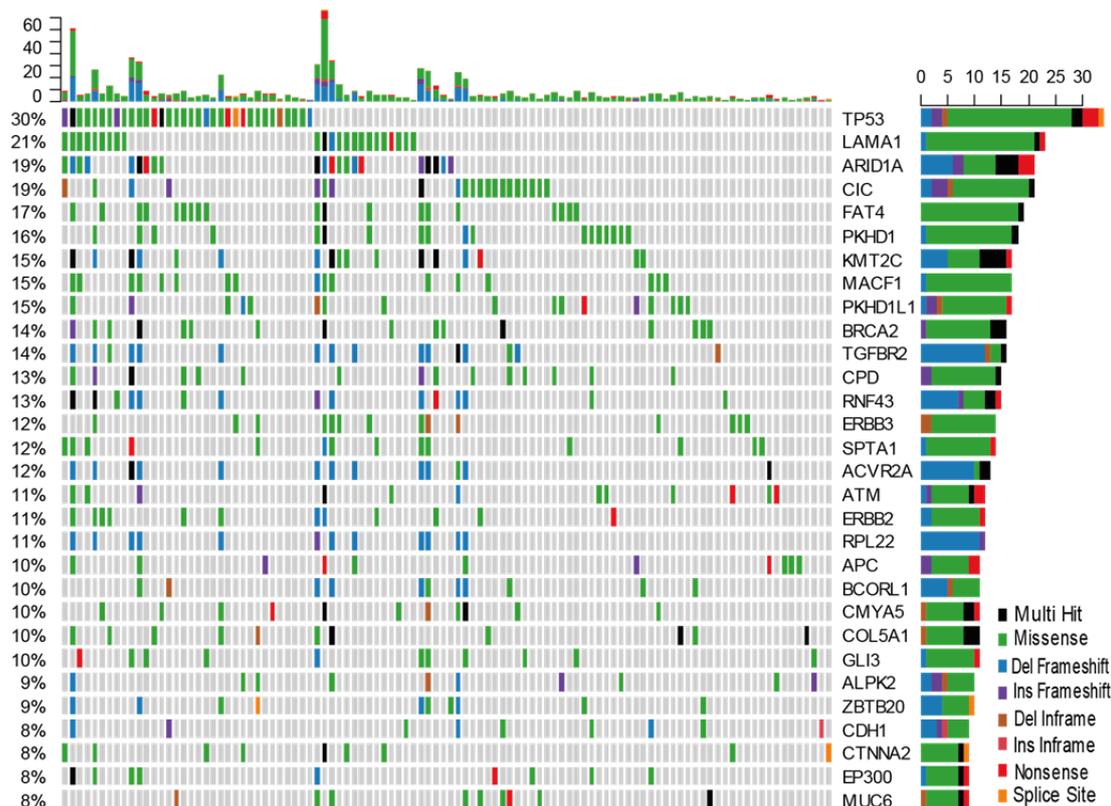
Na Tabela 6 pode-se avaliar a FM dos 15 genes mais mutados em nossa coorte em comparação ao TCGA (análise completa, n=427 casos) e ao COSMIC (*Catalogue of Somatic Mutations in Cancer*).

Realizamos análises comparativas dos perfis mutacionais observados em subgrupos de interesse clínico de acordo com sexo, idade, histologia (classificações de Lauren e da OMS), topografia dos tumores (proximais x distais).

**Tabela 6** - FM de genes selecionados: TCGA x COSMIC x A.C. Camargo Cancer Center.

	TCGA n=427	COSMIC*	A.C. Camargo Cancer Center n=112
<i>TP53</i>	32%	34%	30%
<i>LAMA1</i>	10%	9%	21%
<i>ARID1A</i>	10%	12%	19%
<i>CIC</i>	2%	3%	19%
<i>FAT4</i>	15%	13%	17%
<i>PKHD1</i>	5%	7%	16%
<i>KMT2C</i>	7%	9%	15%
<i>MACF1</i>	7%	6%	15%
<i>PKHD1L1</i>	4%	6%	15%
<i>BRCA2</i>	4%	4%	14%
<i>TGFBR2</i>	3%	9%	14%
<i>CPD</i>	1,6%	2%	13%
<i>RNF43</i>	2%	6%	13%
<i>ERBB3</i>	6%	6%	12%
<i>SPTA1</i>	10%	13%	12%

**Nota.** Selecionados os 15 genes mais mutados na coorte do A.C. Camargo Cancer Center; na base de dados COSMIC, a FM dos genes está calculada a partir de um número variado de casos para cada gene. O número de casos para a análise dos genes desta tabela variou, aproximadamente, de 900 a 5000 tumores. FM: frequência mutacional; TCGA: *The Cancer Genome Atlas*; COSMIC: *Catalog of Somatic Mutations in Cancer*;

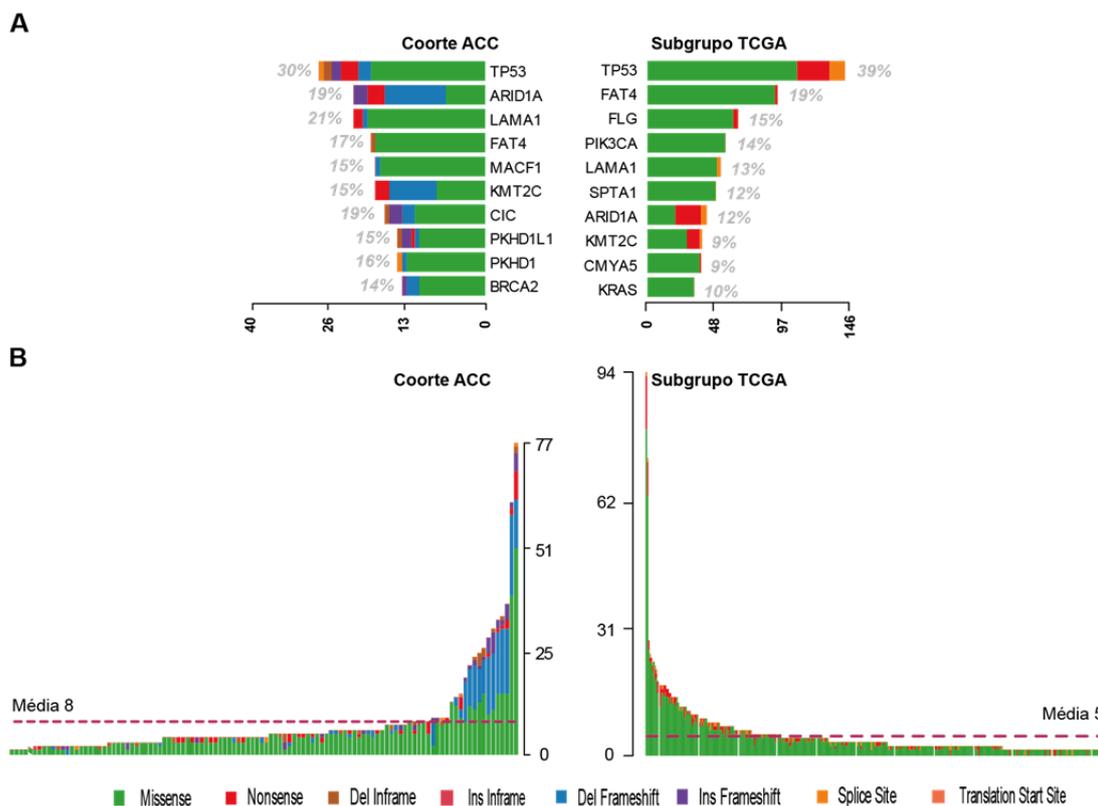


**Figura 13** - Oncoplot com os 30 genes de maior frequência mutacional entre os tumores analisados (n=112).

#### 4.2.1 PMT de acordo com a idade dos pacientes (<50 anos x >50 anos)

A idade mediana dos pacientes desta coorte foi 64 anos, mas 23% deles (26/112) tinham idade menor ou igual a 50 anos ao diagnóstico. Neste subgrupo, contabilizamos 77 variantes não-sinônimas e 47 sinônimas (relação NS/S: 1,64) distribuídas em 48 genes, enquanto no grupo acima de 50 anos contabilizamos 773 variantes não sinônimas e 178 sinônimas (relação NS/S: 4,34) em 94 genes. A relação NS/S foi significativamente maior no grupo com idade >50 anos ( $p < 0,0001$ ).

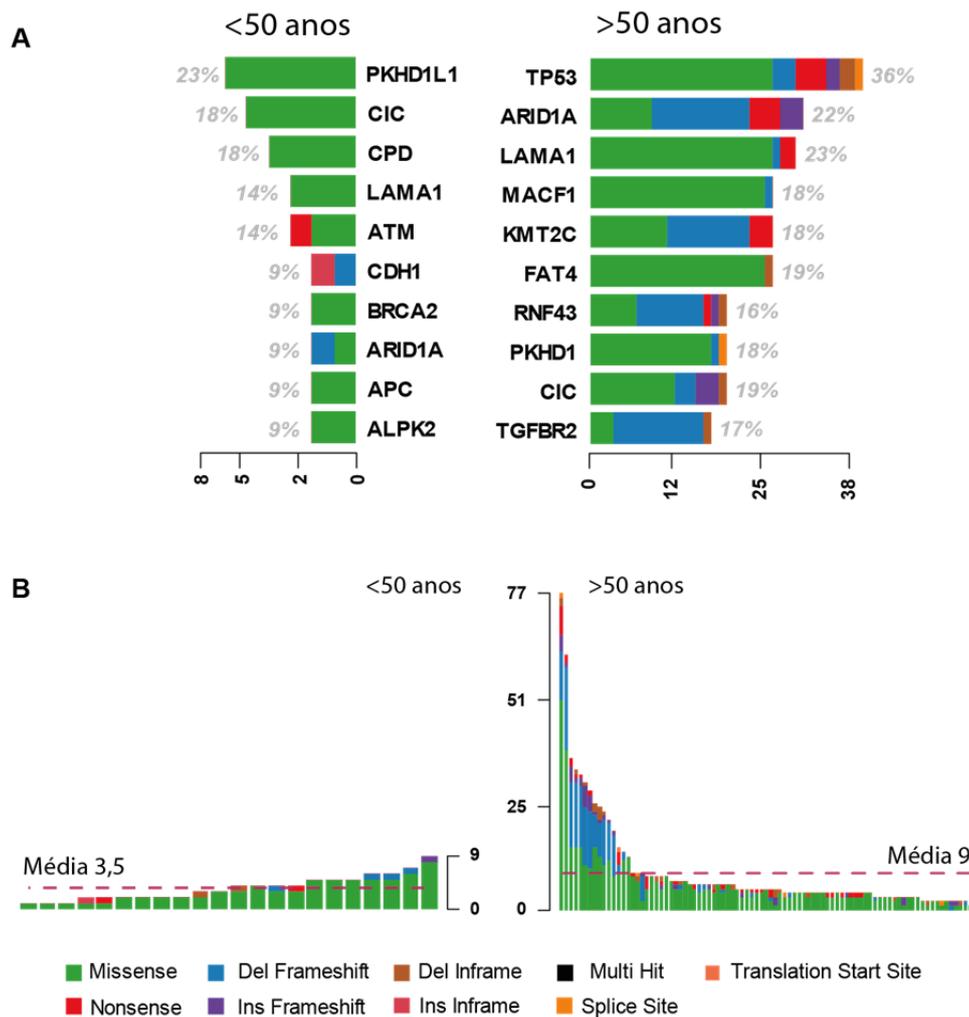
Nos casos mais jovens, observamos uma menor média de mutações por tumor do que na população acima de 50 anos (3,5 x 9, respectivamente;  $p = 0,0001$ ) (Figura 15). A Figura 15 também ilustra as diferenças entre os 10 genes mais mutados de acordo com o subgrupo etário: apenas 3 genes são coincidentes entre os dez mais mutados nos dois subgrupos etários avaliados (*CIC*, *LAMA1* e *ARID1A*).



**Figura 14** - Coorte A.C. Camargo Cancer Center (ACC) x TCGA (subgrupo com os mesmos 99 genes do painel de captura).

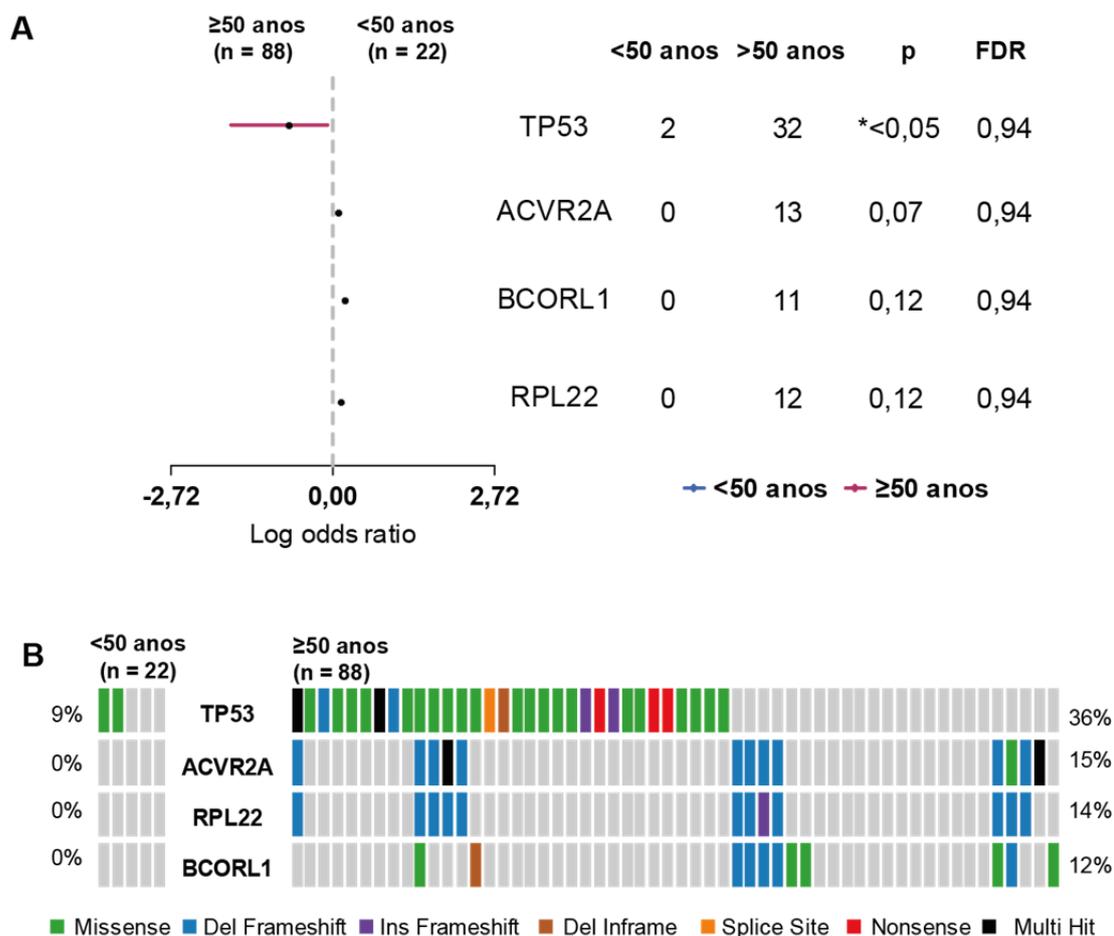
(A) Comparação dos 10 genes mais mutados. (B) Número de mutações por amostra.

Os casos com idade inferior a 50 anos apresentaram significativamente menos mutações em *TP53* do que os casos com idade mais avançada ( $p < 0,05$ ; FDR 0,94). Dentre os mais jovens, encontramos apenas 2 tumores com mutação em *TP53* (2/26; 9%), em comparação a 32 nos casos acima de 50 anos (32/88; 36%). Além disso, 3 genes frequentemente mutados nos tumores de pacientes acima de 50 anos (*ACVR2A*, 15%; *RPL22*, 14%; *BCORL1*, 12%) não apresentaram mutações entre os pacientes mais jovens (Figura 16).



**Figura 15** - Perfil mutacional de acordo com o grupo etário dos pacientes (<50 anos x ≥50 anos).

(A) Genes mais mutados em cada grupo etário. (B) Número de mutações por paciente de acordo com o grupo etário.



**Figura 16** - Genes diferencialmente mutados de acordo com o grupo etário dos pacientes ( $< 50$  anos x  $\geq 50$  anos).

(A) Forest plot comparando os genes preferencialmente mutados em cada grupo etário. (B) Co-Oncoplot com a frequência mutacional dos genes com maior discrepância entre os dois grupos etários.

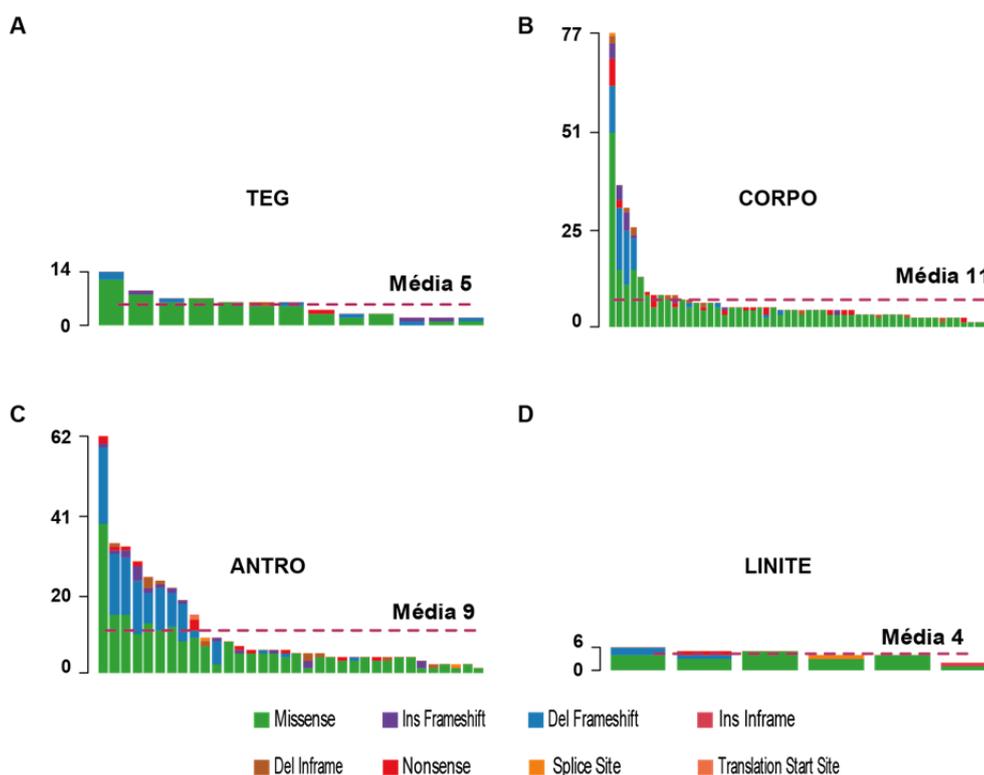
Dentre os 443 casos de AdG do TCGA, 32 tinham menos de 50 anos (7,2%) e em apenas 23 deles foram anotadas variantes nos mesmos genes do painel de captura. Comparando os casos  $< 50$  anos com aqueles  $\geq 50$  anos, não observamos diferenças significativas na média de mutações por tumor (6 x 5, respectivamente) nem genes diferencialmente mutados em um dos grupos. No entanto, quando analisamos o TCGA completo (não restrito aos genes do painel), observamos que a média de mutações por tumor foi significativamente maior nos casos mais jovens (211 x 178;  $p < 0,001$ ), assim como a relação NS/S (3,42 x 2,53;  $p < 0,0001$ ).

#### 4.2.2 PMT segundo a localização do tumor

Os tumores localizados na TEG (n=13) apresentaram 69 variantes NS em regiões codificadoras e 17 variantes sinônimas (relação NS/S: 4,1). Essas variantes distribuíram-se em 40 genes e a média de mutações por amostra foi 5 (7 Mut/Mb) (Figura 17).

No corpo gástrico (n=56), os tumores apresentaram 380 variantes NS e 111 variantes sinônimas (relação NS/S: 3,42) em 86 genes. Em média, os tumores do corpo do estômago apresentaram 7 mutações (9 Mut/MB) (Figura 17B).

Contabilizamos 369 variantes NS e 90 variantes sinônimas nos tumores localizados no antro gástrico (n=34), com relação NS/S 4,1. Nessa região, os tumores apresentaram em média 11 mutações por amostra (15 Mut/MB) distribuídas em 85 genes (Figura 17C).



**Figura 17** - Mutações por amostra segundo a localização do tumor.

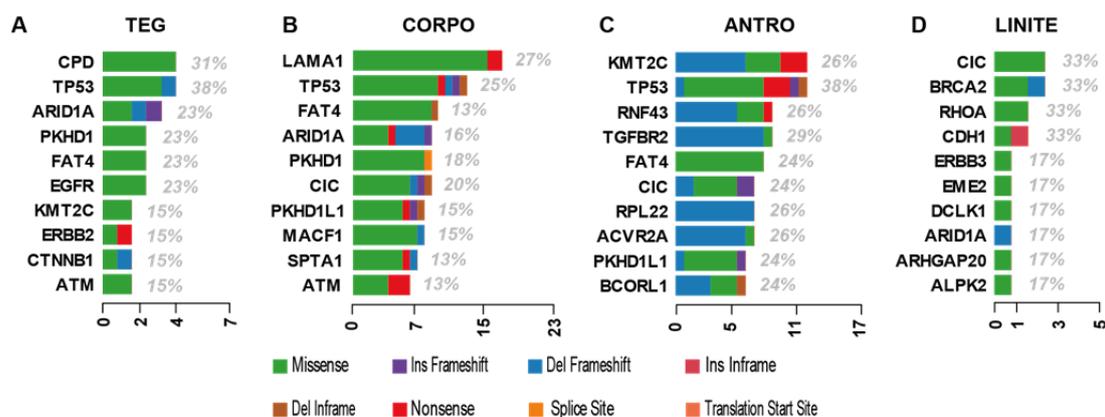
TEG: Transição esôfago-gástrica.

Os tumores que se apresentaram na forma de linite plástica (n=7) apresentaram 25 variantes NS e 5 sinônimas (relação NS/S: 5,2) em apenas 19 genes. Neles, observamos a menor média de mutações por amostra (4, equivalente a 5 Mut/Mb) (Figura 17D).

Apesar da maior média de mutações por amostra nos tumores localizados no antro e no corpo em comparação aos tumores localizados na TEG e aqueles na forma de linite, as diferenças não foram estatisticamente significativas. A relação NS/S também semelhante entre os grupos, exceto entre os tumores do corpo gástrico e os tumores na forma de linite (3,4 x 5,2, respectivamente;  $p=0,00018$ ).

Os genes mais frequentemente mutados em cada localização divergiram consideravelmente. Por exemplo, entre os 10 genes mais mutados nos tumores da TEG apenas 5 coincidiram com os genes mais mutados em tumores do corpo gástrico (*TP53*, *PKHD1*, *ARID1A*, *FAT4* e *ATM*), apenas 3 coincidiram com os genes mais mutados em tumores de antro (*TP53*, *KMT2C* e *FAT4*) e apenas 1 coincidiu com os genes mais mutados em tumores na forma de linite (*ARID1A*) (Figura 18).

A Figura 20 apresenta os genes com FM discrepante em cada localização comparada ao conjunto dos demais casos. Dentre eles, observamos que *EGFR* esteve mais mutado nos tumores da TEG (23% x 3%;  $p=0,02$ ; FDR 0,47).



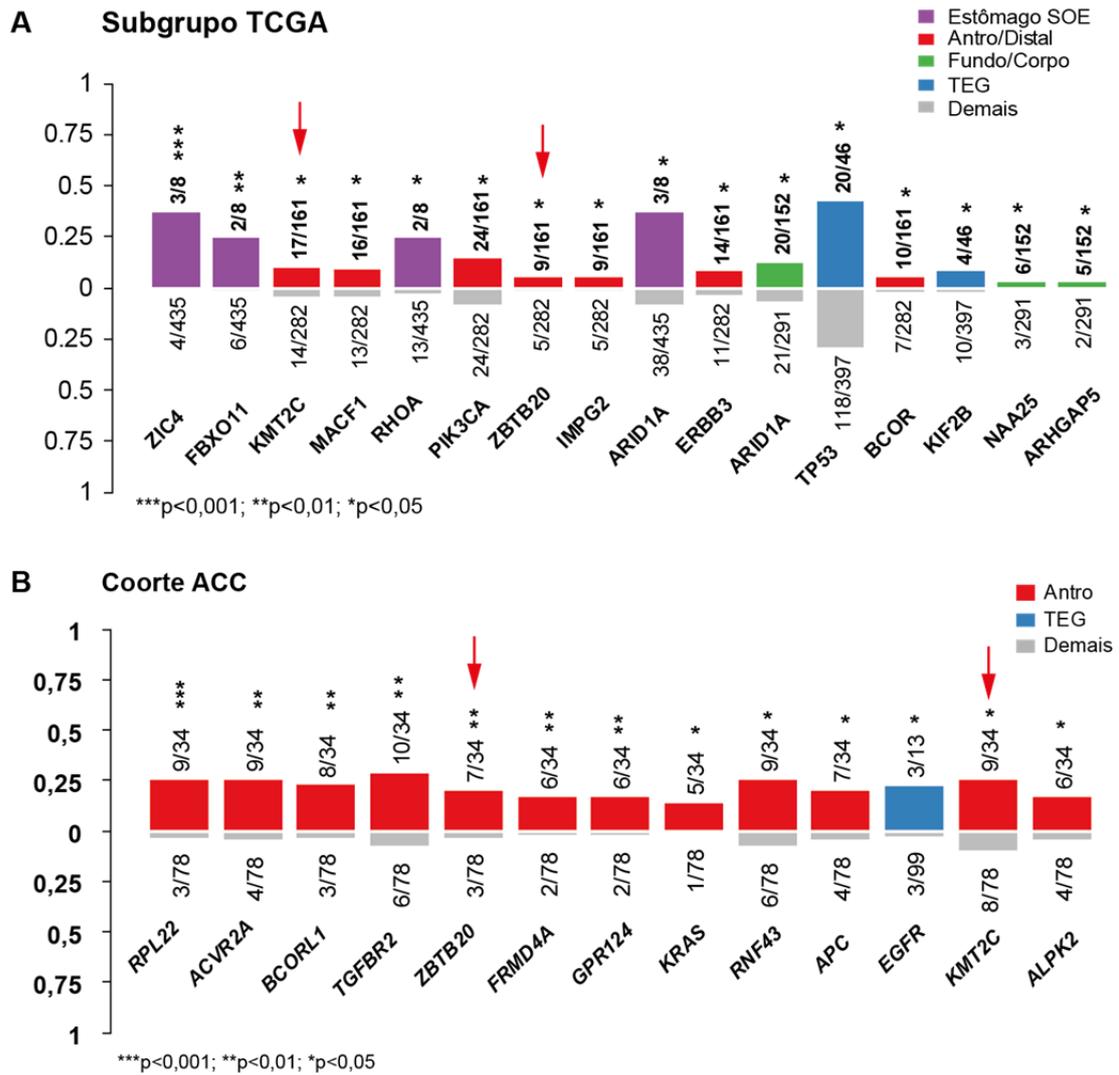
**Figura 18** - Dez genes mais mutados de acordo com a localização do tumor. TEG: transição esôfago-gástrica.

Outros genes também apresentaram FM consideravelmente mais alta nos tumores da TEG em relação às demais localizações: *CPD* (31% x 11%, respectivamente), *MSH6* (15% x 5%, respectivamente) e *MEDAG* (15% x 5%). Além disso, o gene *CIC*, que figurou entre os 5 mais mutados entre todos os tumores (Figura 13), não apresentou mutações nos tumores da TEG.

Os tumores do antro gástrico mostraram-se enriquecidos de mutações nos genes *RPL22* ( $p < 0,001$ ; FDR 0,25), *ACVR2A* ( $p < 0,01$ ; FDR 0,25), *BCORL1* ( $p < 0,01$ ; FDR 0,25), *TGFBR2* ( $p < 0,01$ ; FDR 0,27), *ZBTB20* ( $p < 0,01$ ; FDR 0,3), *FRMD4A* ( $p < 0,01$ ; FDR 0,3), *GPR124* ( $p < 0,01$ ; FDR 0,3), *KRAS* ( $p < 0,01$ ; FDR 0,3), *RNF43* ( $p < 0,05$ ; FDR 0,3), *APC* ( $p < 0,01$ ; FDR 0,45), *KMT2C* ( $p < 0,01$ ; FDR 0,66), *ALPK2* ( $p < 0,01$ ; FDR 0,83) (Figura 19B).

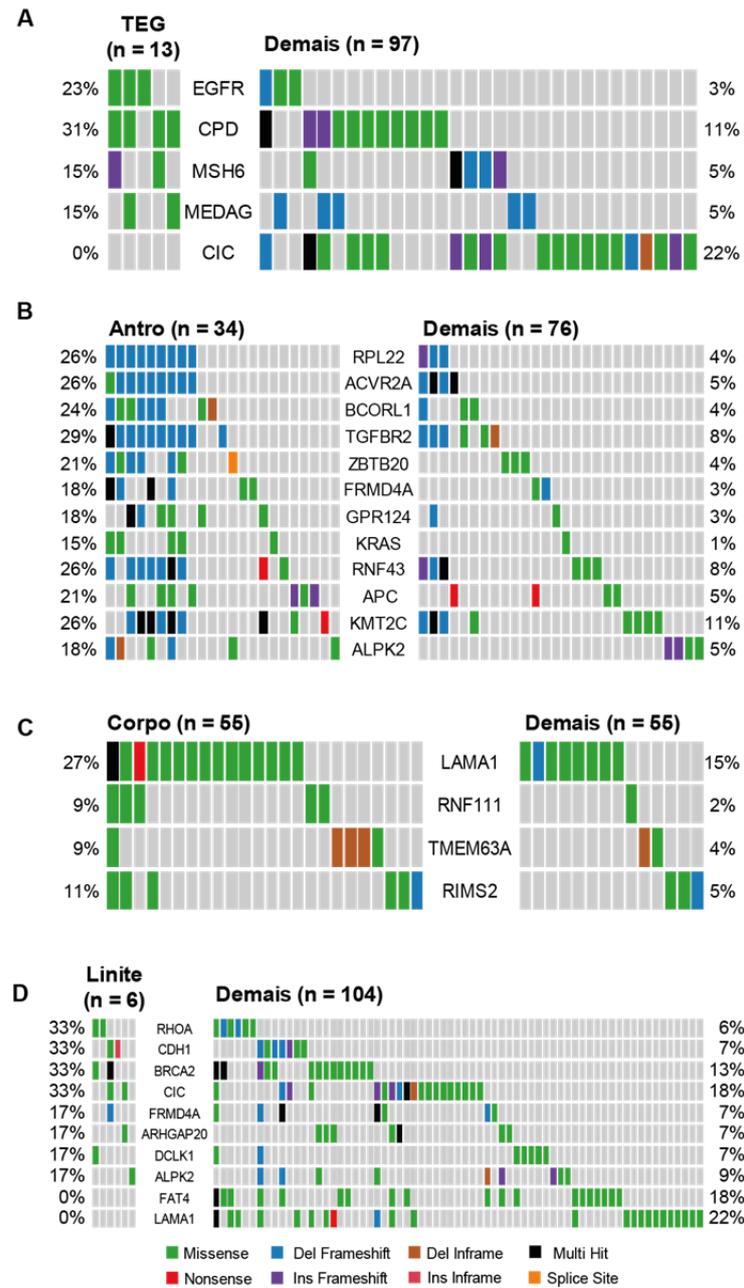
Quase todos esses genes apresentam FM pelo menos 3x maior nos tumores de antro em comparação às demais localizações. A exceção é *KMT2C*, cuja FM foi 2,4x maior nos tumores do antro (26% x 11%) (Figura 20).

Dentre esses genes, *KMT2C* e *ZBTB20* também se mostraram preferencialmente mutados nos tumores de antro na coorte do TCGA (subgrupo incluindo apenas os 99 genes do painel) (Figura 19A).



**Figura 19** - Genes com frequência mutacional discrepante de acordo com a localização do tumor.

(A) TCGA (subgrupo com os mesmos 99 genes do painel de captura). (B) Coorte A.C. Camargo Cancer Center. As setas indicam os genes que, em ambas as coortes, mostraram-se enriquecidos nos tumores do antro gástrico (*ZBTB20* e *KMT2C*).



**Figura 20** - Co-Oncoplots com frequências mutacionais de acordo com a localização do tumor.

TEG: Transição esôfago-gástrica.

Entre os tumores que se apresentaram na forma de linite, apesar do reduzido número de amostras (7 casos, um dos quais não apresentou mutações em nenhum dos 99 genes do painel), chama atenção a maior FM de alguns genes em relação aos demais tumores: *RHOA* (33% x 6%, respectivamente;  $p=0,08$ ), *CDH1* (33% x 7%;  $p=0,1$ ), *BRCA2* (33% x 13%;  $p=0,3$ ), *CIC* (33% x 18%;  $p=0,4$ ), *FRMDA4* (17% x 7%;  $p=0,4$ ), *ARHGAP20* (17% x 7%;  $p=0,4$ ), *DCLK1* (17% x 7%;  $p=0,4$ ) e *ALPK2* (17% x 9%;  $p=0,5$ ) (Figura 20D). Embora esse subgrupo tenha apresentado menor média de mutações por tumor, parece haver um grupo de genes preferencialmente mutado nos tumores apresentados na forma de linite plástica.

Os AdG localizados no corpo, apesar de representarem o maior subgrupo da coorte ( $n=56$ ), apresentaram um menor conjunto de genes com FM consideravelmente diferente do observado para as demais localizações: *LAMA1* (27% x 15%, respectivamente;  $p=0,08$ ), *RNF111* (9% x 11%;  $p=0,1$ ), *TMEM63A* (9% x 4%;  $p=0,2$ ) e *RIMS2* (11% x 5%;  $p=0,24$ ) (Figura 20C).

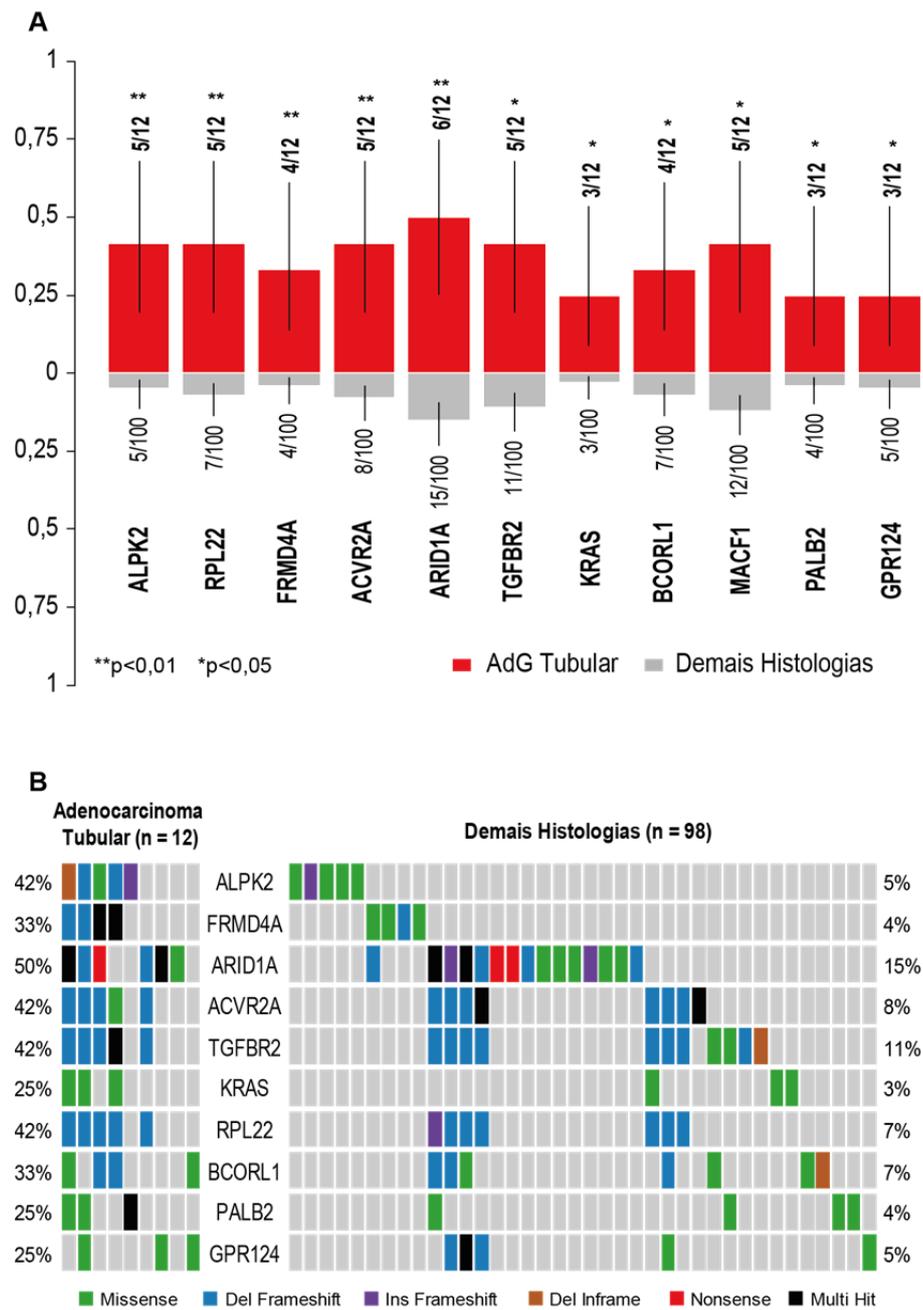
#### 4.2.3 PMT de acordo com o tipo histológico (OMS)

Avaliando o PMT de acordo com o tipo histológico (OMS), observamos genes preferencialmente mutados no AdG tubular (AdG-T): *ALPK2* ( $p<0,01$ ; FDR 0,29), *RPL22* ( $p<0,01$ ; FDR 0,31), *FRMD4A* ( $p<0,01$ ; FDR 0,31), *ACVR2A* ( $p<0,01$ ; FDR 0,31), *ARID1A* ( $p<0,01$ ; FDR 0,49), *TGFBR2* ( $p<0,05$ ; FDR 0,52), *KRAS* ( $p<0,05$ ; FDR 0,52), *BCORL1* ( $p<0,05$ ; FDR 0,52), *MACF1* ( $p<0,05$ ; FDR 0,52), *PALB2* ( $p<0,05$ ; FDR 0,67) e *GPR124* ( $p<0,05$ ; FDR 0,91).

Nesta casuística, dos 12 casos descritos como AdG-T, 9 localizaram-se no antro, 1 na TEG e 2 no corpo. Como esperado, observamos uma coincidência de 8 dos 11 genes (72,7%) enriquecidos no AdG-T com os genes enriquecidos nos tumores do antro gástrico (*RPL22*, *ACVR2A*, *BCORL1*, *TGFBR2*, *FRMD4A*, *GPR124*, *KRAS* e *ALPK2*).

O AdG-T usualmente correlaciona-se com o tipo intestinal de Lauren. Nesta casuística, 8 dos 12 casos (66,7%) descritos como AdG-T foram

descritos como tendo padrão intestinal de Lauren, 3 casos foram descritos como tipo difuso de Lauren e 1 caso foi descrito como misto.



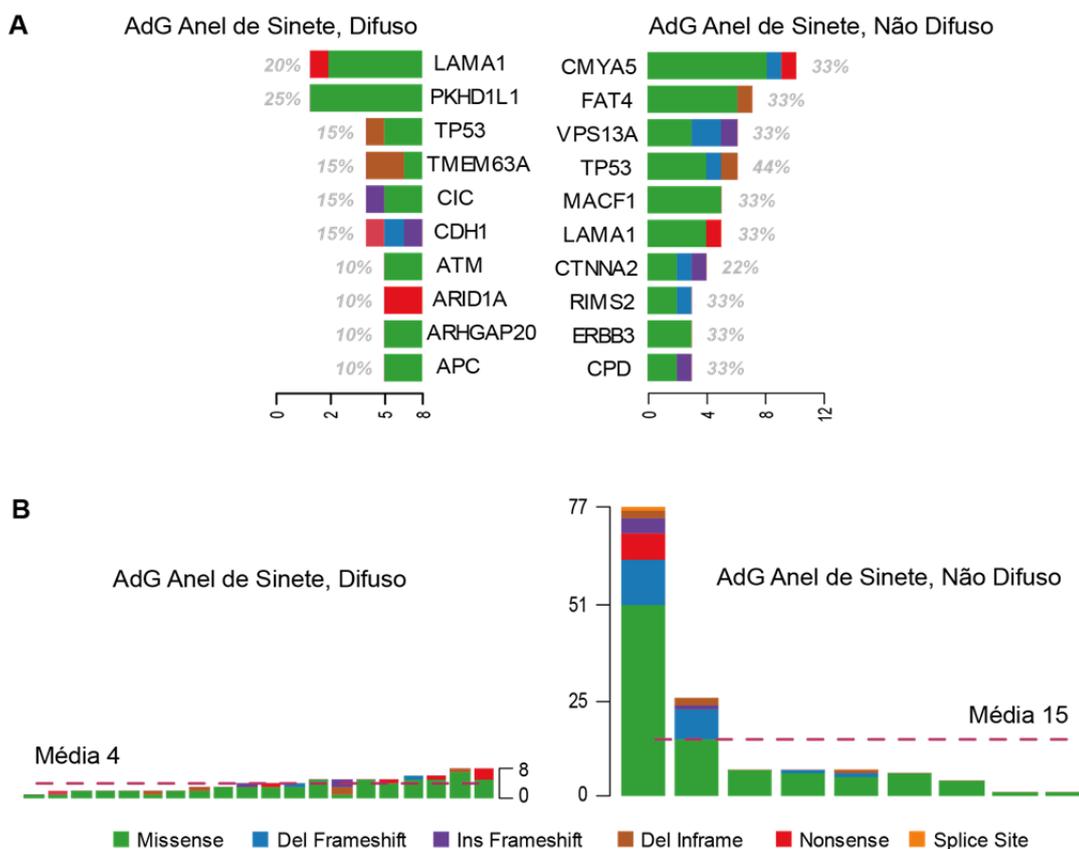
**Figura 21** - Genes com frequência mutacional discrepante entre adenocarcinoma tubular e demais histologias.

Nos AdG-T observamos também uma associação com a carga mutacional dos tumores (CMT). Quatro dos 12 tumores com histologia tubular apresentaram CMT alta (33,3%) em comparação a apenas 8% dos demais casos (8/100;  $p=0,02$ ). A definição de CMT pode ser encontrada no item 4.2.5.

Entre os AdG em anel de sinete (AdG-SI) não foram observados genes diferencialmente mutados com significância estatística em comparação aos demais subtipos histológicos (OMS), mas identificamos nesse grupo dois padrões de mutações distintos.

Comparando os AdG-SI tipo difuso de Lauren com os AdG-SI não-difusos, apenas 2 genes são coincidentes entre os dez mais mutados nos dois subgrupos (*LAMA1* e *TP53*) e a média de mutações entre os 9 AdG-SI não-difusos (15 mutações por amostra) foi quase 4 vezes maior que a média entre os AdG-SI difusos (4 mutações por amostra), claramente influenciada por duas amostras entre os AdG-SI não-difusos (GCY107T e EST48T) que se encaixam na definição de hipermutados com 77 e 26 mutações, respectivamente (Figura 22) . Excluindo estes 2 casos extremos, ainda assim observamos um número de mutações por amostra um pouco maior nos AdG-SI não-difusos em comparação aos AdG-SI difusos (medianas de 7 e 4, respectivamente).

A relação NS/S nos AdG-SI difusos (2,5) foi significativamente menor do que nos AdG-SI não-difusos (5,78;  $p=0,01$ ).



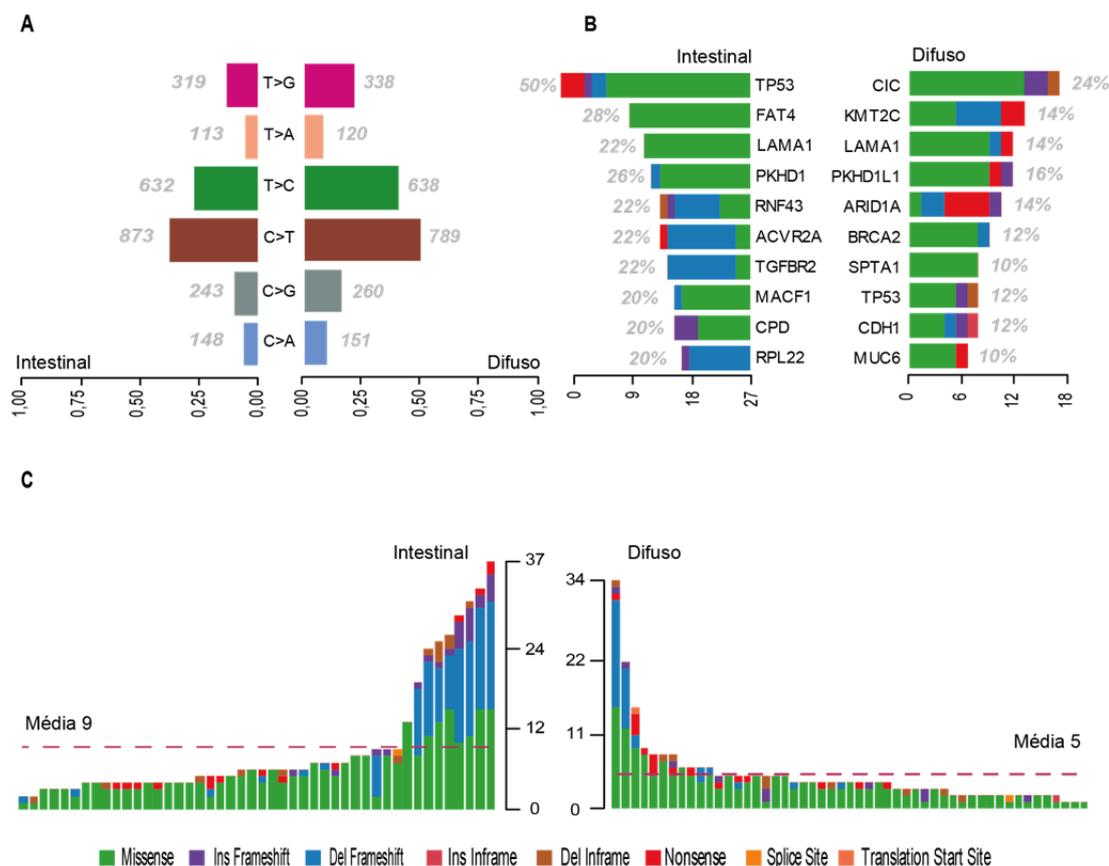
**Figura 22** - Genes mais mutados e número de mutações por amostra nos AdG-SI difusos x não-difusos.

AdG-SI: adenocarcinoma em anel de sinete.

#### 4.2.4 PMT de acordo com o subtipo de Lauren

A comparação dos subtipos histológicos de acordo com a classificação de Lauren (Figura 23C) revelou que os AdG-I apresentaram maior média de mutações por tumor que os AdG-D (9 x 5 mutações por tumor, respectivamente;  $p < 0,0001$ ).

Nos 46 tumores classificados como AdG-I observamos 420 mutações somáticas em regiões codificadoras distribuídas em 86 genes. Contabilizamos 92 mutações silenciosas, determinando uma razão mutações NS/S 4,56.



**Figura 23** - Perfil mutacional dos tumores de tipo intestinal (n=46) e difuso (n=51).

(A) Distribuição das trocas de nucleotídeos mais comumente observadas. (B) Comparação dos 10 genes mais mutados em cada subgrupo. (C) Número de mutações por tumor.

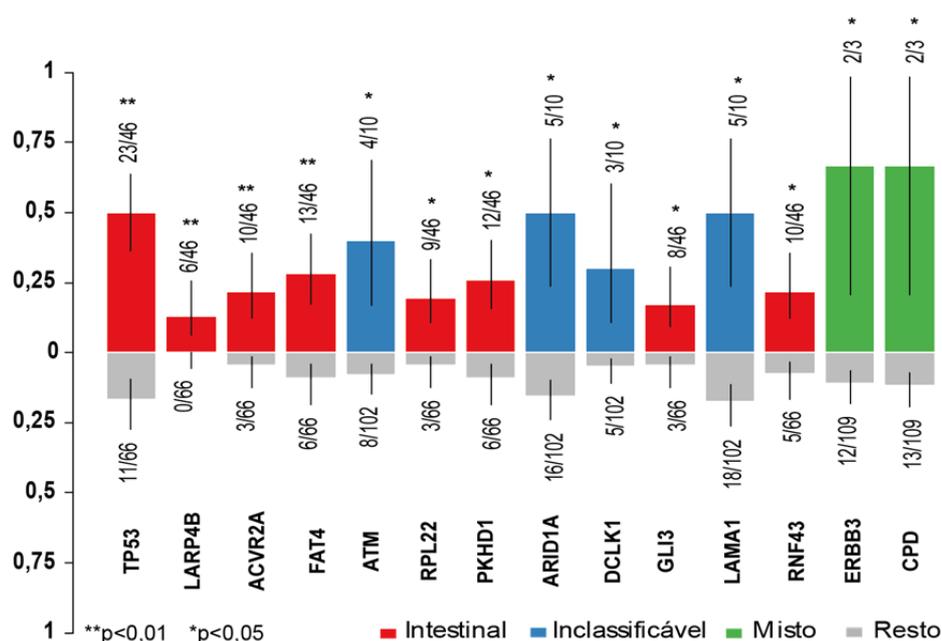
Em 51 amostras classificadas como AdG-D contabilizamos 245 mutações NS em regiões codificadoras de 75 genes, além de 87 mutações silenciosas, com relação NS/S 2,8. A relação NS/S foi significativamente menor nos AdG-D em comparação aos AdG-I ( $p=0,005$ ).

Há claras diferenças no perfil de mutações entre esses dois tipos subtipos histológicos. Apenas *TP53* e *LAMA1* são coincidentes entre os 10 genes mais mutados em cada grupo. Ainda assim, a FM de *TP53* é 50% entre os AdG-I e apenas 12% entre os AdG-D e a FM de *LAMA1* foi 22% entre os AdG-I e 14% entre os AdG-D (Figura 23B).

Observamos que alguns genes estão preferencialmente mutados nos AdG-I em comparação aos demais subtipos de Lauren analisados conjuntamente: *TP53* ( $p<0,001$ ; FDR=0,037), *LARPB4* ( $p<0,01$ ; FDR=0,4),

*ACVR2A* ( $p < 0,01$ ; FDR=0,43), *FAT4* ( $p < 0,01$ ; FDR=0,43), *RPL22* ( $p < 0,05$ ; FDR=0,46), *PKHD1* ( $p < 0,05$ ; FDR=0,48), *GLI3* ( $p < 0,05$ ; FDR=0,52) e *RNF43* ( $p < 0,05$ ; FDR=0,52) (Figura 24).

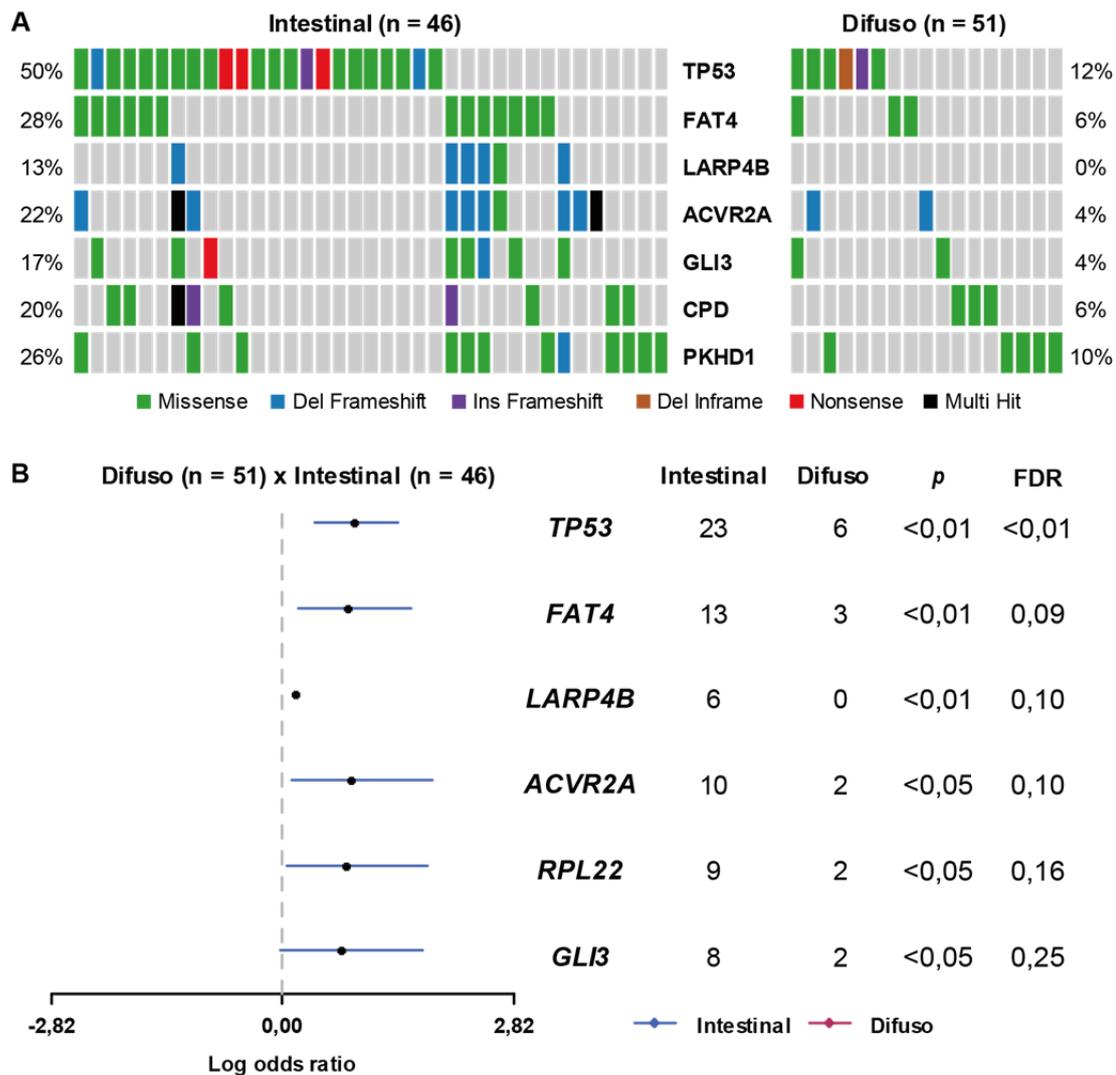
Entre os AdG-M observamos enriquecimento para mutações em *ERBB3* ( $p < 0,05$ ; FDR=0,63) e *CPD* ( $p < 0,05$ ; FDR=0,68). Já entre os AdG-INC, observamos enriquecimento para os genes *ATM* ( $p < 0,05$ ; FDR=0,46), *ARID1A* ( $p < 0,05$ ; FDR=0,5), *DCLK1* ( $p < 0,05$ ; FDR=0,52) e *LAMA1* ( $p < 0,05$ ; FDR=0,52) (Figura 24).



**Figura 24** - Genes diferencialmente mutados de acordo com o subtipo de Lauren.

Apesar da análise acima descrita não ter revelado genes preferencialmente mutados em tumores AdG-D, a comparação direta entre os tumores AdG-I e AdG-D denota diferenças marcantes na FM de alguns genes dos dois grupos. Na Figura 25 pode-se perceber as discrepâncias de FM em alguns genes comparando AdG-I x AdG-D, respectivamente: *TP53* (50% X 12%;  $p < 0,0001$ ; FDR<0,01), *FAT4* (28% x 6%;  $p < 0,05$ ; FDR=0,09), *LARP4B* (13% x 0%;  $p < 0,05$ ; FDR=0,1), *ACVR2A* (22% x 4%;  $p < 0,05$ ; FDR=0,1), *GLI3* (17% x 4%;  $p < 0,05$ ; FDR=0,25). Em outros dois genes, *CPD*

(20% x 6%) e *PKHD1* (26% x 10%), observamos FM bem maior entre os AdG-I do que nos AdG-D, mas sem significância estatística.



**Figura 25** - Genes com frequências mutacionais discrepantes entre AdG-I e AdG-D.

AdG-i: adenocarcinoma intestinal; AdG-d adenocarcinoma difuso. FDR: *False Discovery Rate*.

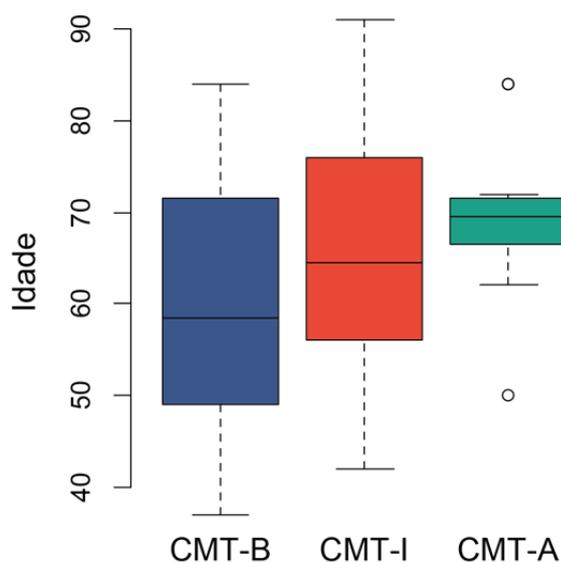
#### 4.4.5 Carga mutacional dos tumores (CMT)

Doze tumores (10,7%) foram classificados como CMT-A ( $\geq 19$  variantes), 42 (37,7%) como CMT-I ( $>4$  e  $<19$  variantes) e 56 (50%) como CMT-B ( $\leq 4$  variantes).

Nas amostras com CMT-A contabilizamos 419 variantes NS e 82 variantes sinônimas (NS/S: 5,1) em 90 genes. A média de variantes por amostra nesse grupo foi 35 e a mediana 29,5.

Nos tumores CMT-I, foram contabilizadas 279 variantes NS e 67 variantes sinônimas (NS/S: 4,2) em 75 genes. A média de variantes por amostra foi 7 e a mediana 6.

Por fim, nos tumores CMT-B contabilizamos 154 variantes NS e 76 variantes sinônimas (NS/S: 2) em apenas 66 genes. A média e a mediana de variantes nesse grupo foram 3.



**Figura 26** - Carga mutacional dos tumores x idade ao diagnóstico.

CMT: carga mutacional dos tumores; CMT-B: baixa ( $\leq 4$ ); CMT-I: intermediária ( $>4$  &  $<19$ ); CMT-A: alta ( $\geq 19$ ).

**Tabela 7** - Características clínicas dos casos segundo a carga mutacional dos tumores (CMT).

		CMT-B (n=58)	CMT-I (n=42)	CMT-A (n=12)	<i>p</i>
		N (%)	N (%)	N (%)	
<b>Sexo</b>	<b>M</b>	34 (58,6)	32 (76,2)	5 (41,7)	0,05
	<b>F</b>	24 (41,4)	10 (23,8)	7 (58,3)	
<b>Idade (anos)</b>	<b>Média</b>	60	65	69	0,02*
	<b>Mediana</b>	59	65	70	
	<b>Mín.-Máx.</b>	37-84	42-91	50-84	
<b>Localização</b>	<b>TEG</b>	6 (10,3)	7 (16,7)	0 (0)	0,2
	<b>Corpo</b>	32 (55,2)	20 (47,6)	4 (33,3)	
	<b>Antro</b>	14 (24,1)	12 (28,6)	8 (66,7)	
	<b>Linite</b>	4 (6,9)	3 (7,1)	0 (0)	
	<b>Coto gástrico</b>	2 (3,4)	0 (0)	(0)	
<b>Histologia (OMS)</b>	<b>AdG SOE</b>	33 (56,9)	21 (50)	5 (41,7)	0,3
	<b>AdG-SI</b>	16 (27,6)	12 (28,6)	2 (16,7)	
	<b>AdG-P</b>	1 (1,7)	0 (0)	0 (0)	
	<b>AdG-T</b>	3 (5,2)	5 (11,9)	4 (33,3)	
	<b>CPD</b>	5 (8,6)	4 (9,5)	1 (8,3)	
<b>Lauren</b>	<b>Intestinal</b>	17 (29,3)	21 (50)	8 (66,6)	0,06
	<b>Difuso</b>	34 (58,6)	17 (40,5)	2 (16,7)	
	<b>Misto</b>	2 (3,4)	1 (2,4)	0 (0)	
	<b>Inclassificável</b>	5 (8,6)	3 (7,1)	2 (16,7)	
<b>Estadiamento (AJCC 7ª Ed.)</b>	<b>IA</b>	9 (16,1)	6 (14,3)	1 (8,3)	0,3
	<b>IB</b>	4 (7,1)	4 (9,5)	0 (0)	
	<b>IIA</b>	6 (10,7)	3 (7,1)	3 (25)	
	<b>IIB</b>	5 (8,9)	3 (7,1)	2 (16,7)	
	<b>IIIA</b>	7 (12,5)	4 (9,5)	1 (8,3)	
	<b>IIIB</b>	12 (21,4)	4 (9,5)	1 (8,3)	
	<b>IIIC</b>	7 (12,5)	8 (19)	4 (33,3)	
	<b>IV</b>	6 (10,7)	10 (23,8)	0 (0)	
<b>EBV</b>	<b>Negativo</b>	54 (93,1)	41 (97,6)	12 (100)	0,7
	<b>Positivo</b>	4 (6,9)	1 (2,4)	0 (0)	

**Nota:** CMT-B: baixa ( $\leq 4$ ); CMT-I: intermediária ( $>4$  &  $<19$ ); CMT-A: alta ( $\geq 19$ ). TEG: transição esôfago-gástrica; AdG-SOE: adenocarcinoma sem outras especificações; AdG-SI: adenocarcinoma em anel de sinete; AdG-P adenocarcinoma papilífero; AdG-T: adenocarcinoma tubular; CPD: carcinoma pouco diferenciado; EBV: Epstein Barr Virus.

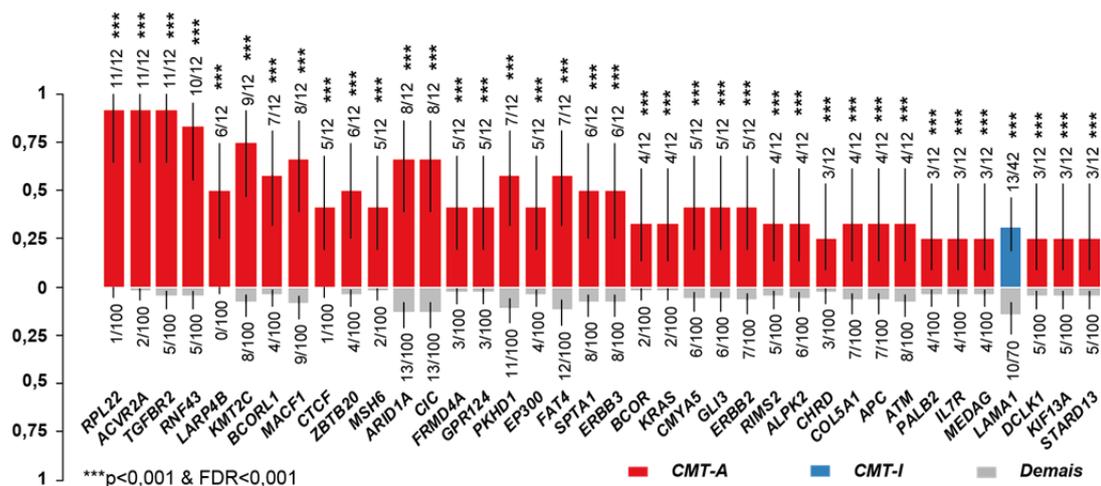
As características clínicas dos casos de acordo com a CMT estão descritas na Tabela 7. Observamos uma associação limítrofe entre sexo e CMT ( $p=0,05$ ) e uma forte associação entre idade e CMT ( $p=0,02$ ). A média de idade dos casos com CMT-A foi 69 anos, em comparação a 59 anos no grupo com CMT-B (FDR=0,04). A Figura 26 demonstra a distribuição dos casos estudados de acordo com a idade e a CMT.

Não observamos associação entre CMT e outras características clínicas como localização dos tumores ( $p=0,2$ ), estadiamento ( $p=0,3$ ), EBV ( $p=0,7$ ) e histologia (OMS;  $p=0,3$ ). Além disso, não encontramos associação entre CMT e ancestralidade genômica ( $p=0,4$ ).

Considerando todos os níveis da classificação de Lauren (intestinal, difuso, misto e inclassificável), não observamos associação entre Lauren e CMT ( $p=0,06$ ). Contudo, a comparação direta entre AdG-D e AdG-I revela uma proporção maior de CMT-A nos AdG-I (3,9% x 17,4%;  $p=0,04$ ). Por outro lado, a proporção de CMT-B é consideravelmente maior entre os AdG-D (64,1% x 36,9%;  $p=0,009$ ).

Quanto ao perfil mutacional, observamos 26 genes preferencialmente mutados (FDR<0,05) nos tumores CMT-A em relação aos demais. São eles: *RPL22*, *ACVR2A*, *TGFBR2*, *RNF43*, *LARP4B*, *KMT2C*, *BCORL1*, *MACF1*, *CTCF*, *ZBTB20*, *MSH6*, *ARID1A*, *CIC*, *FRMD4A*, *GPR124*, *PKHD1*, *EP300*, *FAT4*, *SPTA1*, *ERBB3*, *BCOR*, *KRAS*, *CMYA5*, *GLI3*, *ERBB2* e *RIMS2* (Figura 27).

Dentre esses genes, *RPL22*, *ACVR2A*, *LARP4B*, *CTCF*, *MSH6*, *SPTA1* e *KRAS* não apresentaram variantes NS em nenhum dos 58 casos com CMT-B, enquanto *LARP4B* apresentou variantes NS exclusivamente nos tumores com CMT-A.

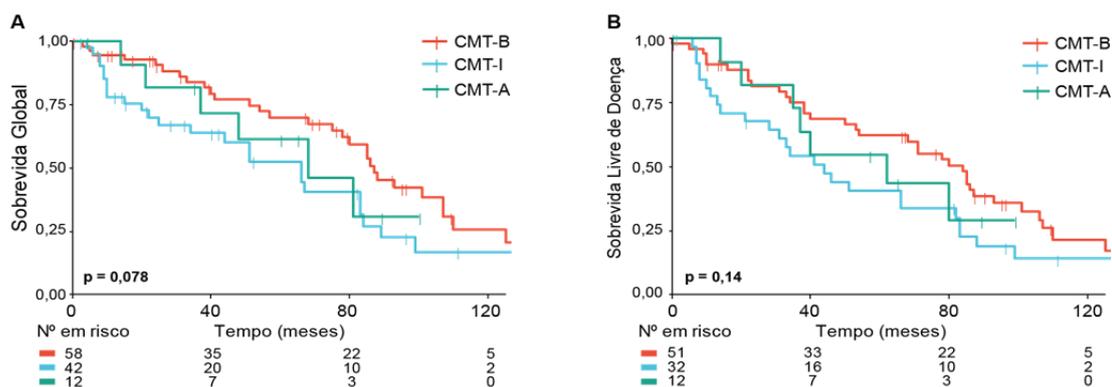


**Figura 27** - Genes diferencialmente mutados de acordo com a carga mutacional dos tumores.

CMT-I: carga mutacional dos tumores intermediária (>4 & <19); CMT-A: carga mutacional dos tumores alta ( $\geq 19$ ).

Os casos com CMT-B apresentaram SG mediana 87 meses (IC95% 80-110). O grupo com CMT-I apresentou SG mediana 66 meses (IC95% 44-89) e nos casos com CMT-A a mediana de SG foi 68 meses (IC95% 37-NA). Essa diferença, embora clinicamente relevante ( $\Delta T$  19-21 meses), não se revelou estatisticamente significativa ( $p=0,08$ ) (Figura 28).

Observamos efeito semelhante quanto à SLD. A mediana de SLD foi 84 meses (IC95% 54-106) nos casos com CMT-B, 44 meses (IC95% 28-83) no grupo CMT-I e 62 meses (IC95% 37-NA) nos casos com CMT-A ( $p=0,1$ ). (Figura 28).



**Figura 28** - Sobrevida global e sobrevida livre de doença de acordo com a CMT.

CMT: carga mutacional dos tumores; CMT-B: baixa ( $\leq 4$ ); CMT-I: intermediária ( $>4$  &  $<19$ ); CMT-A: alta ( $\geq 19$ ).

#### 4.4.6 Exomas

Vinte e quatro dos 112 casos da coorte (21,4%) tiveram o perfil mutacional tumoral avaliado tanto pelo painel de captura quanto por sequenciamento completo do exoma.

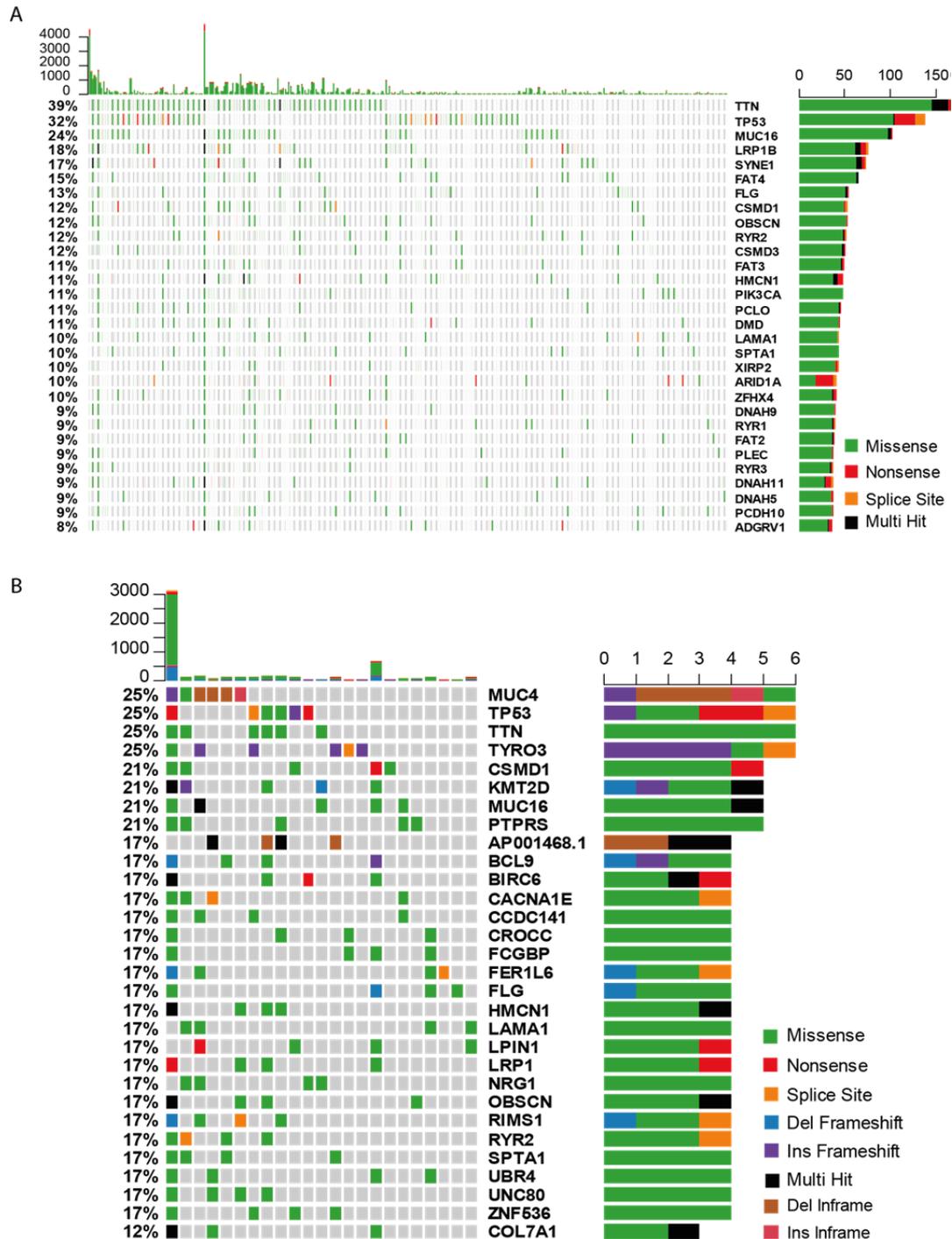
No sequenciamento desses exomas, atingimos uma cobertura média de 65x, com 94,7% das bases alcançando cobertura mínima de 10x.

Contabilizamos 5723 variantes em regiões codificadoras (586 deleções *frameshift*, 164 inserções *frameshift*, 20 deleções *inframe*, 17 inserções *inframe*, 4639 mutações *missense*, 182 *nonsense*, 3 *nonstop*, 102 *splice site* e 10 *translation start site*) e 2030 variantes sinônimas. A relação NS/S foi 2,0. As mutações em regiões codificadoras distribuíram-se em 4378 genes. Os 30 genes mais mutados nas amostras com exoma sequenciado (AES) estão demonstrados na Figura 29.

As características clínicas desse subgrupo de pacientes podem ser observadas na Tabela 8. Não observamos diferenças estatisticamente significativas entre o grupo AES em relação à coorte inteira.

Comparamos o perfil mutacional do grupo AES em relação ao TCGA. Conforme mostra a Figura 29, os 30 genes mais mutados em ambos os grupos há apenas 10 genes coincidentes (*TTN*, *TP53*, *MUC16*, *FLG*, *OBSCN*, *CSMD1*, *RYR2*, *HMCN1*, *LAMA1* e *SPTA1*). No entanto,

estendendo a avaliação para todos os 4378 genes mutados na nossa coorte, observamos que apenas 474 deles (10,8%) não tem mutações na coorte do TCGA.



**Tabela 8** - Características clínicas dos casos com exoma sequenciado em comparação a coorte inteira.

		<b>Exomas</b>	<b>Coorte Inteira</b>	<b>p</b>
		<b>N (%)</b>	<b>N (%)</b>	
<b>Sexo</b>	<b>M</b>	17 (70,8)	71 (63)	0,65
	<b>F</b>	7 (29,2)	41 (37)	
<b>Idade (anos)</b>	<b>Média</b>	31	63	0,68
	<b>Mediana</b>	61	64	
	<b>Mín.-Máx.</b>	(37-85)	(37-91)	
<b>Localização</b>	<b>TEG</b>	4 (16,7)	13 (11,6)	0,6
	<b>Corpo</b>	9 (37,5)	56 (50)	
	<b>Antro</b>	8 (33,3)	34 (30,4)	
	<b>Linite</b>	2 (8,3)	7 (6,2)	
	<b>Coto gástrico</b>	1 (4,2)	2 (1,8)	
<b>Histologia</b>	<b>Adenocarcinoma SOE</b>	12 (50)	59 (52,7)	0,73
	<b>Adenocarcinoma anel de sinete</b>	6 (25)	30 (26,8)	
	<b>Adenocarcinoma papilífero</b>	1 (4,2)	1 (0,9)	
	<b>Adenocarcinoma tubular</b>	3 (12,5)	12 (10,7)	
	<b>Carcinoma pouco diferenciado</b>	2 (8,3)	10 (8,9)	
<b>Lauren</b>	<b>Intestinal</b>	10 (41,7)	46 (41,1)	0,77
	<b>Difuso</b>	10 (41,7)	53 (47,3)	
	<b>Misto</b>	1 (4,1)	3 (2,7)	
	<b>Inclassificável</b>	3 (12,5)	10 (8,9)	
<b>Cirurgia do primário</b>	<b>Sim</b>	23 (95,8)	111 (99,1)	0,33
	<b>Não</b>	1 (4,2)	1 (0,9)	
<b>Estadiamento (AJCC 7<sup>a</sup> Ed.)</b>	<b>IA</b>	1 (4,2)	17 (15,2)	0,71
	<b>IB</b>	2 (8,3)	8 (7,1)	
	<b>IIA</b>	3 (12,5)	12 (10,7)	
	<b>IIB</b>	2 (8,3)	11 (9,8)	
	<b>IIIA</b>	5 (12,5)	12 (10,7)	
	<b>IIIB</b>	2 (12,5)	17 (15,2)	
	<b>IIIC</b>	5 (25)	19 (17)	
	<b>IV</b>	4 (16,7)	16 (14,3)	
<b>EBV</b>	<b>Negativo</b>	22 (91,7)	107 (95,5)	0,6
	<b>Positivo</b>	2 (8,3)	5 (4,5)	

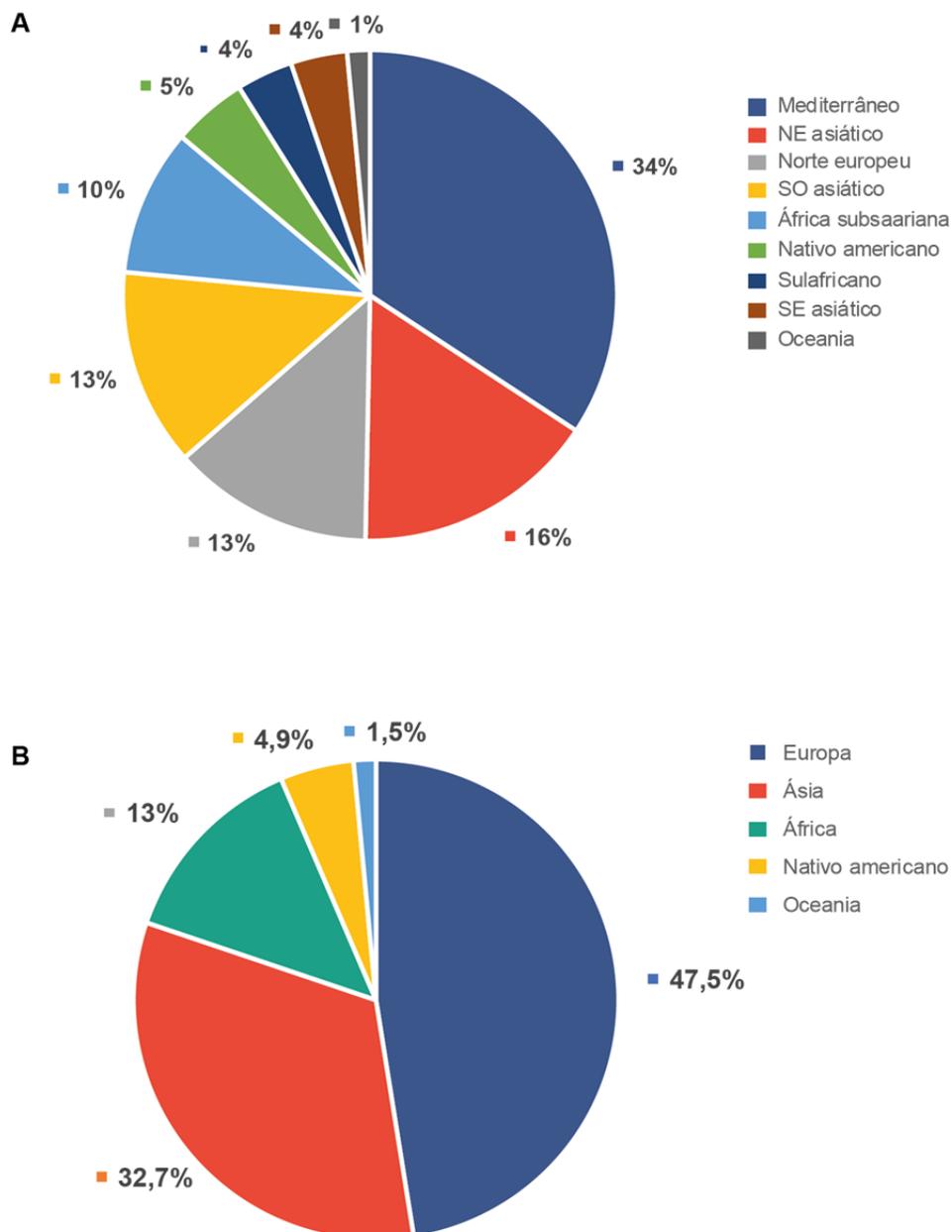
#### 4.4.7 Ancestralidade genômica

Determinamos a ancestralidade genômica dos 112 casos da coorte estudada a partir das leituras *on-target* e *off-target* conforme descrito no item 3.2.6. Em média, as amostras avaliadas apresentaram 406 SNPs informativos de ancestralidade (Figura 3).

A Figura 30 mostra a ancestralidade genômica média dos casos desta coorte, considerando as nove populações-referências (Mediterrâneo, Norte da Europa, Nordeste Asiático, Nativo Americano, Oceania, Sul da África, Sudeste Asiático, Sudoeste Asiático, África Subsaariana) (Figura 30A) e agregando as subpopulações asiáticas, europeias e africanas (Figura 30B). Em média, a coorte apresentou ancestralidade 47,5% europeia, 32,7% asiática, 13,4% africana, 4,9% nativo americano e 1,5% Oceania.

Para avaliação das amostras individualmente, uma ancestralidade foi considerada predominante quando mais de 50% dos MIA em uma amostra estivessem relacionados a uma única população-referência. Devido ao tamanho da amostra (112 casos), decidimos agregar as ancestralidades em apenas 3 grupos: europeu (Mediterrâneo + Norte da Europa), asiático (Nordeste Asiático + Sudoeste Asiático + Sudeste Asiático + Nativo Americano) e africano (África Subsaariana + Sul da África).

A avaliação individual dos casos revelou que a ancestralidade europeia foi predominante (62/112; 55,4%), seguida da asiática (31/112; 27,7%) e da africana (10/112; 8,9%) (Figura 31). Em 9 casos não observamos predominância de ancestralidade (8%). Esses casos foram denominados como altamente miscigenados (AM) para fins de diferenciação das demais ancestralidades.

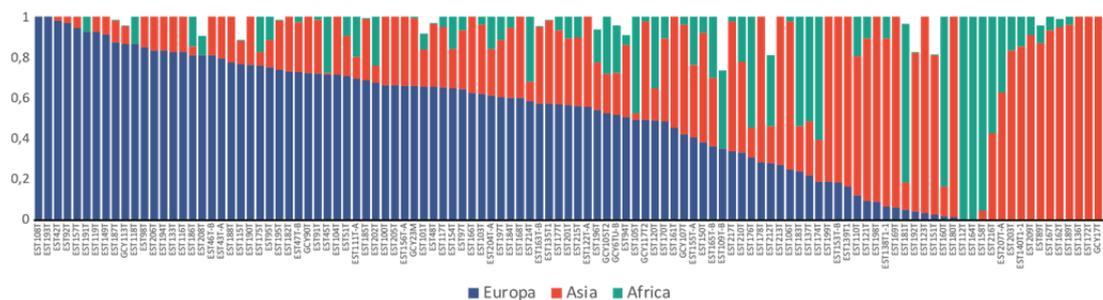


**Figura 30** - Ancestralidade média da coorte.

(A) Considerando as nove populações-referência (Mediterrâneo, Norte da Europa, Nordeste Asiático, Nativo Americano, Oceania, Sul da África, Sudeste Asiático, Sudoeste Asiático, África Subsaariana). (B) Agregando as subpopulações da Europa (Mediterrâneo + Norte da Europa), Ásia (Nordeste Asiático + Sudeste Asiático + Sudoeste Asiático) e África (Sul da África + África Subsaariana).

**Tabela 9** - Características clínicas dos casos de acordo com a ancestralidade genômica predominante.

		<b>Europa n=62</b>	<b>Asia n=31</b>	<b>Africa n=10</b>	<b>Altamente miscigenados n=9</b>	<b>p</b>
		<b>N (%)</b>	<b>N (%)</b>	<b>N (%)</b>	<b>N (%)</b>	
<b>Sexo</b>	<b>M</b>	34 (54,8)	20 (64,5)	8 (80)	9 (100)	0,04*
	<b>F</b>	28 (45,2)	11 (35,5)	2 (20)	0 (0)	
<b>Idade (anos)</b>	<b>Média</b>	61	64	68	63	0,58
	<b>Mediana</b>	62	66	69	64	
	<b>Mín.-Máx.</b>	(37-91)	(40-85)	(49-85)	(43-83)	
<b>Localização</b>	<b>TEG</b>	6 (9,7)	6 (19,4)	1 (10)	0 (0)	0,34
	<b>Corpo</b>	35 (56,5)	12 (38,7)	6 (60)	3 (33,3)	
	<b>Antro</b>	17 (27,4)	8 (25,8)	3 (30)	6 (66,7)	
	<b>Linite</b>	3 (4,8)	4 (12,9)	0 (0)	0 (0)	
	<b>Coto gástrico</b>	1 (1,6)	1 (3,2)	0 (0)	0 (0)	
<b>Histologia</b>	<b>AdG SOE</b>	32 (51,6)	19 (61,3)	4 (40)	4 (44,4)	0,57
	<b>AdG anel de sinete</b>	18 (29)	7 (22,5)	2 (20)	3 (33,3)	
	<b>AdG papilífero</b>	0 (0)	1 (3,2)	0 (0)	0 (0)	
	<b>AdG tubular</b>	8 (12,9)	2 (6,5)	2 (20)	0 (0)	
	<b>Carcinoma pouco dif.</b>	4 (6,5)	2 (6,5)	2 (20)	2 (22,2)	
<b>Lauren</b>	<b>Intestinal</b>	25 (40,3)	14 (45,2)	5 (50)	2 (22,2)	0,24
	<b>Difuso</b>	31 (50)	12 (38,7)	4 (40)	6 (66,7)	
	<b>Misto</b>	1 (1,6)	0 (0)	1 (10)	1 (11,1)	
	<b>Inclassificável</b>	5 (8,1)	5 (16,1)	0 (0)	0 (0)	
<b>Cirurgia do primário</b>	<b>Sim</b>	61 (98,4)	31 (100)	10 (100)	9 (100)	0,8
	<b>Não</b>	1 (1,6)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
<b>Estadiamento (AJCC 7<sup>a</sup> Ed.)</b>		10 (16,1)	5 (16,1)	2 (20)	0 (0)	0,68
	<b>IA</b>	5 (8,1)	1 (3,2)	2 (20)	0 (0)	
	<b>IB</b>	5 (8,1)	4 (12,9)	1 (10)	2 (22,2)	
	<b>IIA</b>	6 (9,7)	4 (12,9)	1 (10)	0 (0)	
	<b>IIB</b>	7 (11,3)	1 (3,2)	1 (10)	3 (33,3)	
	<b>IIIA</b>	11 (17,7)	4 (12,9)	0 (0)	2 (22,2)	
	<b>IIIB</b>	10 (16,1)	6 (19,4)	2 (20)	1 (11,1)	
	<b>IIIC</b>	8 (12,9)	6 (19,4)	1 (10)	1 (11,1)	
	<b>IV</b>					
<b>EBV</b>	<b>Negativo</b>	61 (98,4)	29 (93,5)	8 (80)	9 (100)	0,056
	<b>Positivo</b>	1 (1,6)	2 (6,5)	2 (20)	0 (0)	

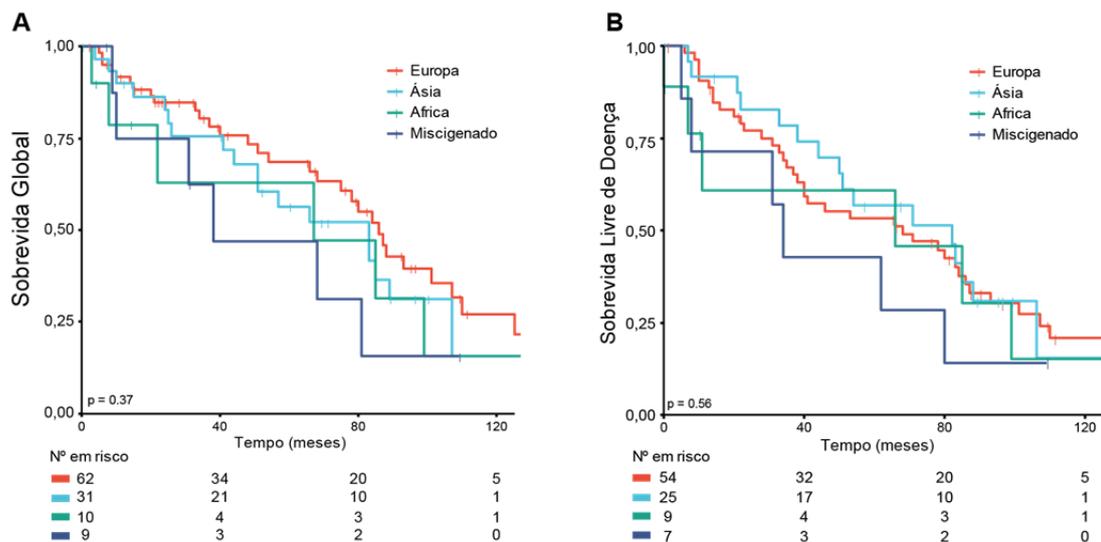


**Figura 31** - Determinação da ancestralidade genômica predominante nos casos da coorte (N=112).

Ancestralidades agregadas em 3 grupos: europeu (Mediterrâneo + Norte da Europa), asiático (Nordeste Asiático + Sudoeste Asiático + Sudeste Asiático + Nativo Americano) e africano (África Subsaariana + Sul da África). Espaços em branco indicam ancestralidade Oceania.

As características clínicas dos pacientes de acordo com sua ancestralidade genômica predominante (AP) podem ser avaliadas na Tabela 9. Observamos uma associação entre sexo e ancestralidade ( $p=0,04$ ), principalmente porque todos os nove casos miscigenados foram do sexo masculino. Além disso, observamos uma possível diferença entre os grupos ancestrais quanto à positividade para EBV ( $p=0,056$ ). Dois dos 5 casos EBV positivos na coorte (40%) foram identificados com ancestralidade africana.

A princípio não observamos associação estatisticamente significativa entre SG ou SLD e ancestralidade (Figura 32). Contudo, os números chamam atenção para a SG numericamente inferior nos grupos com AP africana e nos miscigenados. A SG mediana no grupo com AP europeia foi 86 meses (IC95% 75-110) e no grupo com AP asiática foi 83 meses (IC95% 51-NA). Já no grupo com AP africana a SG mediana foi 67 meses (IC95% 22-NA) e no grupo miscigenado foi 38 meses (IC95% 31-NA). Como pode ser observado na Tabela 9, não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ancestrais quanto à distribuição por estadiamento. No modelo de regressão de Cox ajustado para a variável estágio clínico, a ancestralidade africana mostrou-se associada à SG de maneira independente (HR 2,76; IC95% 1,11-6,86;  $p=0,028$ ).



**Figura 32** - Sobrevida global e sobrevida livre de doença de acordo com a ancestralidade genômica predominante.

A mediana de SLD nos indivíduos com AP europeia foi 68 meses (IC95% 38-86) e naqueles com AP asiática a mediana foi 82 meses (IC95% 44-106). Já nos casos com AP africana a mediana de SLD foi 66 meses (IC95% 0-99) e nos casos miscigenados foi 34 meses (IC95% 5-80). De maneira semelhante ao observado para SG, a AP africana mostrou-se um fator associado à SLD de maneira independente no modelo de regressão de Cox ajustado para estágio clínico (HR 2,53; IC95% 1,02-6,28;  $p=0,044$ )

Contudo, dentre os casos com AP africana, houve uma perda de seguimento precoce (nenhuma consulta registrada após a cirurgia) e um óbito pós-operatório. Portanto, os achados nesse grupo com número muito reduzido de pacientes são exploratórios e devem ser interpretados com cautela.

Quanto ao perfil de mutações, nas amostras com AP europeia ( $n=62$ ) contabilizamos 426 variantes NS e 111 variantes sinônimas (relação NS/S: 3,83) em 88 genes. Os tumores apresentaram em média 7 mutações (9 Mut/Mb).

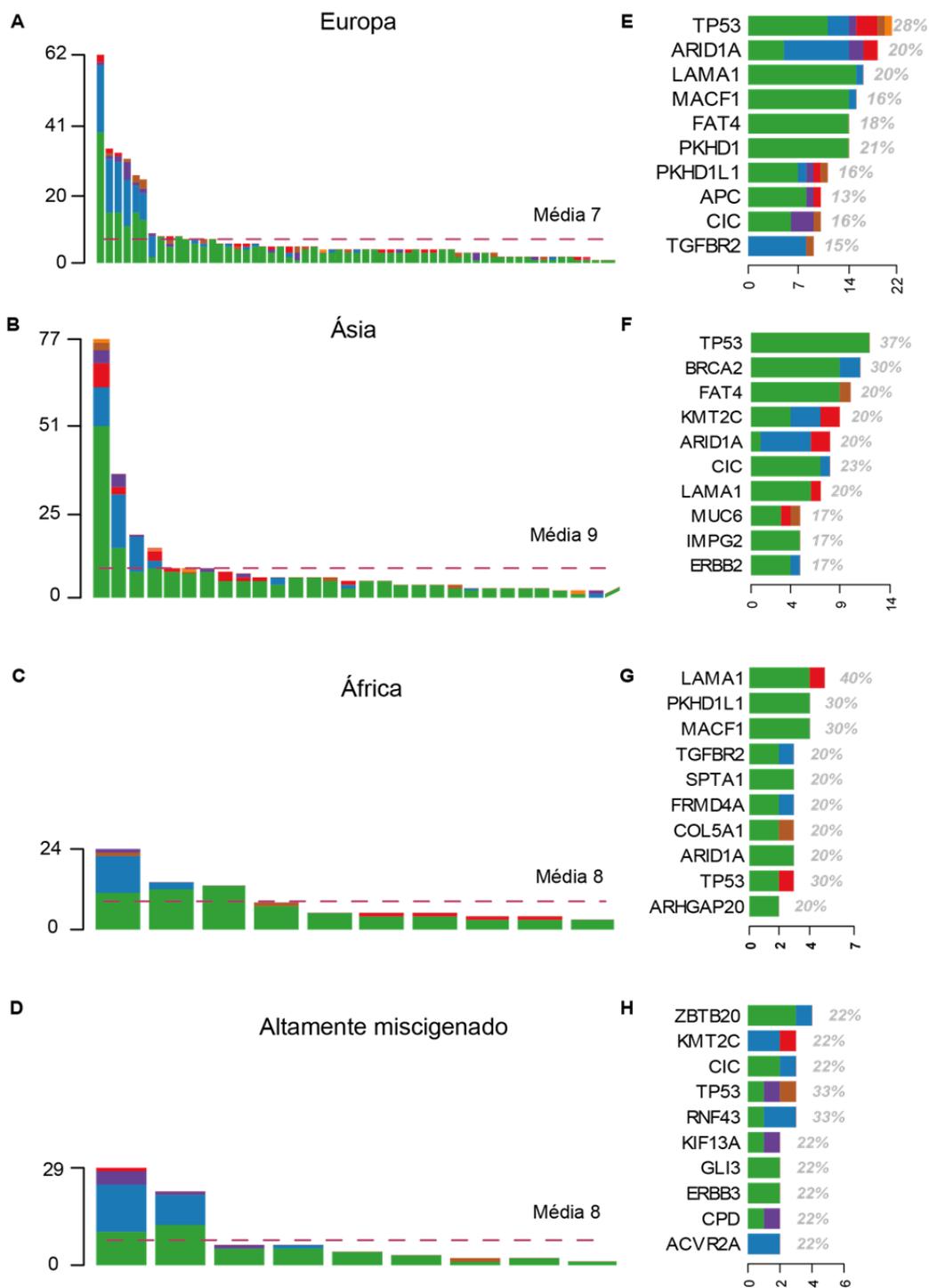
As amostras com AP asiática ( $n=31$ ) apresentaram 267 variantes NS e 71 variantes sinônimas (relação NS/S: 3,76) em 82 genes. Cada tumor tinha em média 8 mutações (11 Mut/Mb).

Nos tumores com AP africana (n=10) contabilizamos 83 variantes NS e 15 variantes sinônimas em 51 genes (relação NS/S: 5,5). A média de mutações por tumor foi 8 (11 Mut/Mb).

Por fim, nos 8 casos miscigenados contabilizamos 74 variantes NS e 28 variantes sinônimas em 50 genes (relação NS/S: 2,64). A média de mutações por tumor neste grupo foi 8 (11 Mut/Mb).

A Figura 33 (E, F, G, H) descreve os 10 genes mais frequentemente mutados de acordo com a ancestralidade predominante. Chama atenção que *BRCA2* e *IMPG2* figuram entre os genes mais mutados apenas nos casos com AP asiática. Esses dois genes mostraram-se diferencialmente mutados nos casos com AP asiática em comparação àqueles com AP europeia (*IMPG2*: p=0,003; FDR=0,1; *BRCA2*: p=0,008; FDR 0,13). Nos grupos com AP africana e nos miscigenados, o reduzido número de amostras dificulta a avaliação de genes diferencialmente mutados. No entanto, chama atenção que dois dos genes mais mutados nos casos com AP africana (*AHRGAP20* e *FRMD4A*) não estejam sequer entre os 30 genes mais mutados na coorte inteira (Figura 13).

Avaliamos o perfil de mutações nos tumores de 52 dos casos da coorte com predominância superior a 75% dos MIAs de uma mesma ancestralidade. Destes, 25 tinham AP europeia, 22 tinha AP asiática e 5 tinham AP africana. Nestes casos, observamos os genes *ARID1A* (p=0,01; FDR 0,95), *TGFBR2* (p=0,03; FDR=0,95) e *ACVR2A* (p=0,04; FDR 0,95) estão mais mutados entre os casos com AP europeia. O gene *FRMD4* esteve mais mutado nos casos com AP africana (p=0,04; FDR=0,95) e o gene *GPR124* esteve preferencialmente mutado entre os indivíduos com AP asiática (p=0,046; FDR 0,95).

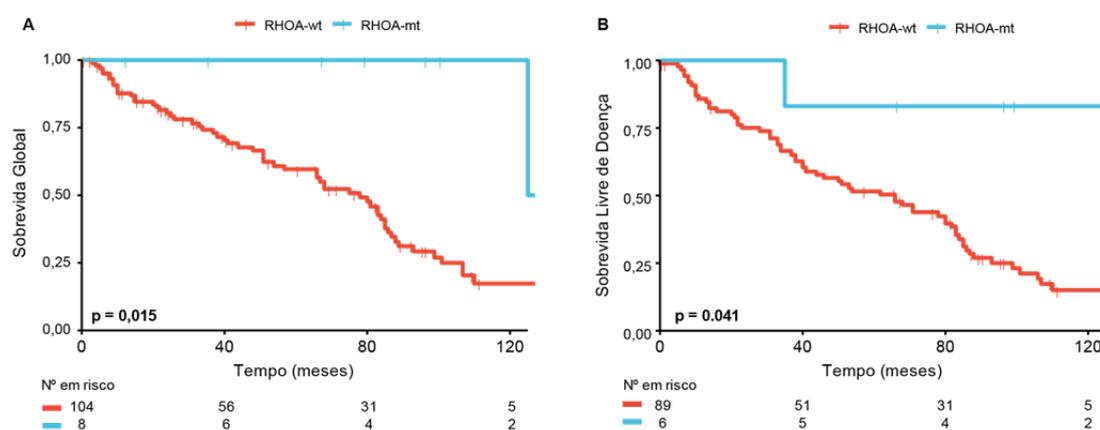


**Figura 33** - Perfil mutacional dos tumores de acordo com a ancestralidade genômica predominante.

Número de mutações por amostra (A, B, C, D) e frequência mutacional dos 10 genes mais mutados em cada grupo ancestral (E, F, G, H).

#### 4.4.8 Impacto prognóstico de *RHOA*

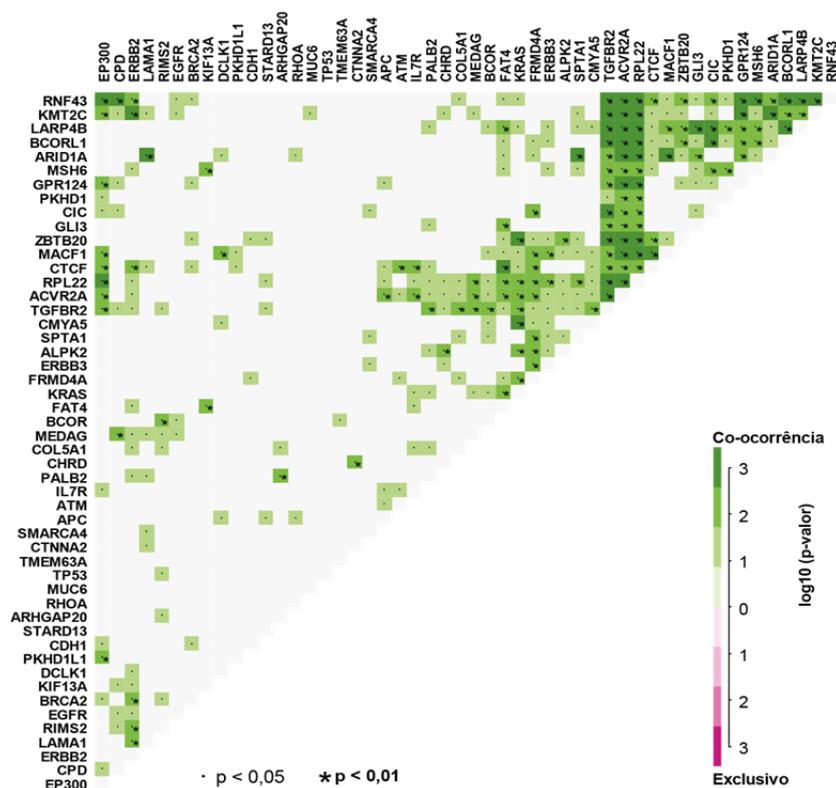
Dentre os genes do painel, *RHOA* (*Ras Homolog Family Member A*) destacou-se por estar associado a um bom prognóstico nessa coorte, apesar do reduzido número de casos com mutação neste gene (n=8). Neles, a SG mediana foi 125 meses (IC95% 125-NA) em comparação a 78 meses nos demais casos (IC95% 57-86) uma diferença clinicamente relevante e estatisticamente significativa (p=0,015; HR 0,13; IC95% 0,018-0,92). De maneira análoga, a SLD foi maior no subgrupo com mutação de *RHOA* (125 meses x 66 meses; p=0,041; HR 0,25 IC95% 0,06-1,05) (Figura 34).



**Figura 34** - Sobrevida global e sobrevida livre de doença de acordo com o *status* mutacional de *RHOA*.

RHOA-wt: sem mutação; RHOA-mut: com mutação.

As principais características clínicas dos casos com e sem mutação de *RHOA* estão descritas na Tabela 11. Seis (75%) dos tumores com mutação de *RHOA* apresentaram-se como estádios III ou IV e dois deles apresentaram EC I ao diagnóstico. Os tumores se dividiam ainda entre tipo intestinal e difuso (3 casos de cada tipo; 37,5% de cada), misto (1 caso; 12,5%) ou inclassificável (1 caso; 12,5%). Não observamos diferenças estatisticamente significativas entre os casos com e sem mutação em *RHOA* em nenhuma das variáveis clínicas analisadas.



**Figura 35** - Análise de co-ocorrência e exclusividade mútua entre os 50 genes mais mutados nos tumores estudados.

**Tabela 10** - Variantes observadas no gene RHOA

Crom	Coord	Ref	Al 1	Al 2	Éxon	Class	HGVSp	Cobertura	FA
3	49412922	T	T	A	2/5	MM	p.Y34F	3302	0,11
3	49412898	T	T	C	2/5	MM	p.Y42C	1844	0,26
3	49412898	T	T	C	2/5	MM	p.Y42C	266	0,48
3	49405969	A	A	C	3/5	MM	p.L57V	129	0,56
3	49397663	T	T	-	5/5	Del Fs	p.K187Nfs*19	508	0,14
3	49412934	A	A	-	2/5	Del Fs	p.F30Sfs*24	2938	0,14
3	49413009	C	C	A	2/5	MM	p.R5L	2290	0,14
3	49405912	C	C	A	3/5	MM	p.D76Y	176	0,32
3	49413015	G	G	C	2/5	MM	p.A3G	100	0,20

Nota. Crom.: Cromossomo; Coord.: coordenada; Ref.: Alelo referência; Al 1 e 2: alelos tumorais 1 e 2; Class.: Classificação da variante; HGVSp: nomenclatura da variante de acordo com a *Human Genome Variation Society*.

Uma análise de interação entre genes revelou a co-ocorrência de mutações entre RHOA e ARID1A ( $p=0,04$ ) e também entre RHOA e APC ( $p=0,03$ ) (Figura 35). Nenhum desses dois genes apresentou impacto significativo em SG ou SLP quando avaliado individualmente ou em conjunto com RHOA.

As mutações encontradas em RHOA podem ser conferidas na Tabela 10.

**Tabela 11** - Características clínicas dos casos com mutação de *RHOA*.

		<i>RHOA</i> mutado (N=8)	<i>RHOA</i> wt (N=104)	<i>p</i>
		N (%)	N (%)	
<b>Sexo</b>	<b>M</b>	3 (37,5)	68 (65,4)	0,11
	<b>F</b>	5 (62,5)	36 (34,6)	
<b>Idade (anos)</b>	<b>Média</b>	58	63	0,25
	<b>Mediana</b>	64	64	
	<b>Mín.-Máx.</b>	(37-69)	(37-91)	
<b>Localização</b>	<b>TEG</b>	0 (0)	13 (12,5)	0,19
	<b>Corpo</b>	4 (50)	52 (50)	
	<b>Antro</b>	2 (25)	32 (30,8)	
	<b>Linite</b>	2 (25)	5 (4,8)	
	<b>Coto gástrico</b>	0 (0)	2 (1,9)	
<b>Histologia</b>	<b>Adenocarcinoma SOE</b>	4 (50)	55 (52,9)	0,99
	<b>Adenocarcinoma anel de sinete</b>	2 (25)	28 (26,9)	
	<b>Adenocarcinoma papilífero</b>	0 (0)	1 (0,9)	
	<b>Adenocarcinoma tubular</b>	1 (12,5)	11 (10,6)	
	<b>Carcinoma pouco diferenciado</b>	1 (12,5)	9 (8,7)	
<b>Lauren</b>	<b>Intestinal</b>	3 (37,5)	43 (41,3)	0,33
	<b>Difuso</b>	3 (37,5)	50 (48,1)	
	<b>Misto</b>	1 (12,5)	2 (1,9)	
	<b>Inclassificável</b>	1 (12,5)	9 (8,7)	
<b>Estadiamento (AJCC 7ª Ed.)</b>	<b>IA</b>	0 (0)	17 (16,3)	0,82
	<b>IB</b>	1 (12,5)	7 (6,7)	
	<b>IIA</b>	1 (12,5)	11 (10,6)	
	<b>IIB</b>	0 (0)	11 (10,6)	
	<b>IIIA</b>	1 (12,5)	11 (10,6)	
	<b>IIIB</b>	1 (12,5)	16 (15,4)	
	<b>IIIC</b>	2 (25)	17 (16,3)	
	<b>IV</b>	2 (25)	14 (13,5)	
<b>EBV</b>	<b>Negativo</b>	8 (100)	99 (95,2)	1
	<b>Positivo</b>	0 (0)	5 (4,8)	

## 5 DISCUSSÃO

O AdG tem figurado entre os tumores mais frequentes e letais no mundo há várias décadas e continua representando um enorme problema de saúde globalmente. No Brasil, a incidência e a mortalidade por AdG estão em queda, espelhando o que vem acontecendo no resto do mundo. Contudo, é importante ressaltar que a mortalidade por AdG está em ascensão em algumas regiões do Brasil, tais como Norte (em homens) e Nordeste (ambos os sexos) (DE SOUZA GIUSTI et al. 2016; GUIMARÃES e MUZI 2012).

A despeito dos avanços recentes na oncologia com a incorporação de novas terapias alvo e imunoterapia para o tratamento de vários tumores sólidos (ex.: câncer de mama, câncer de pulmão, melanoma etc.), os avanços no manejo oncológico do câncer gástrico tem sido mais modestos.

Apenas duas terapias alvo estão aprovadas para o tratamento do AdG metastático (trastuzumabe e ramucirumabe). Em termos de imunoterapia, pembrolizumabe, um anticorpo anti-PD1, foi recentemente aprovado para o tratamento de 3º linha de pacientes com AdG metastático com imunexpressão de PD-L1. Embora os resultados com terapia anti-PD1 sejam promissores, esta história ainda está no seu começo e aguarda novos capítulos.

Nosso estudo objetivou contribuir para o conhecimento sobre o comportamento clínico e o perfil mutacional do AdG em pacientes brasileiros. Além disso, avaliamos pela primeira vez o impacto da ancestralidade genômica dos pacientes no perfil mutacional e nos desfechos clínicos da doença.

A predominância de diagnóstico de AdG em homens é bem descrita na literatura (relação H:M 2,3:1) (DUPONT et al. 1978). Nossa coorte foi composta por 112 pacientes com uma proporção de 1,7 homem para cada mulher. Em geral, a literatura descreve uma desproporção H:M nos tumores do tipo intestinal, com maior número de casos entre os homens. Essa

desproporção é menos acentuada nos tumores do tipo difuso (CREW e NEUGUT 2006). Em nossa coorte, 41% (46/112) dos casos foram do tipo intestinal, com relação H:M 2,1:1 e 47,3% (53/112) foram do tipo difuso, com relação H:M 1,4:1, em total acordo com a literatura.

A mediana de idade na coorte foi 64 anos (37-91), em linha com o reportado historicamente para essa doença (CREW e NEUGUT 2006; DUPONT et al. 1978). O diagnóstico de AdG em uma faixa etária muito abaixo da média gera questionamentos sobre os fatores etiológicos envolvidos e sobre a evolução clínica dos pacientes. Em nossa coorte, 23 indivíduos (20,5%) tinham menos de 50 anos ao diagnóstico de AdG. Em uma coorte coreana com 14.658 pacientes com AdG, 24,5% tinham menos de 50 anos (JEONG e PARK 2011). Nos EUA, em uma coorte com 1.497 casos de AdG diagnosticados entre 1948 e 1973, cerca de 10% tinham menos de 50 anos (DUPONT et al. 1978).

A exclusão de pacientes abaixo de 35 anos e de tumores hereditários provavelmente impactou no reduzido número de casos abaixo de 40 anos em nossa coorte (5/112; 4,4%). Ainda assim, esse percentual é semelhante ao descrito na literatura. GIRYIES (2018) relatou 3,4% de pacientes abaixo de 40 anos em uma base de dados de 95.323 AdG nos EUA (GIRYES et al. 2018). No Japão, NAKAYAMA (2018) relatou 7,5% de casos abaixo de 40 anos em uma coorte de 1184 pacientes (NAKAYAMA et al. 2018).

Quanto ao tipo histológico segundo a classificação da OMS, nossa coorte teve uma predominância de AdG SOE (52,7%; 59/112), seguida por AdG-SI (26,8%; 30/112) e por AdG-T (10,7%; 12/112). Dez casos (8,9%) foram classificados como carcinoma pouco diferenciado. O AdG-SI é relativamente frequente (12-40% dos AdG), sua incidência vem aumentando nos últimos anos e gera especial interesse devido à controvérsia sobre seu impacto prognóstico (CHON et al. 2017; JIMÉNEZ FONSECA et al. 2017; LU et al. 2016; POSTLEWAIT et al. 2015; TAGHAVI et al. 2012).

O AdG-SI está associado ao subtipo difuso de Lauren. Contudo, em nossa casuística, 4 casos de AdG-SI foram denominados inclassificáveis pela classificação de Lauren e 5 outros casos foram classificados como

subtipo intestinal. É possível que esses 9 tumores enquadrem-se, de acordo com a classificação da OMS, no subtipo misto, que inclui tanto um componente pouco coeso quanto um componente glandular. Embora essa incongruência lance um questionamento sobre a classificação histológica desses casos, é importante ressaltar que todos os 112 casos da coorte tinham registradas 2 avaliações histológicas (laudo anátomo-patológico da rotina e do biobanco) e foram ainda revisados pela Dra. Maria Dirlei Begnami (co-orientadora deste trabalho) antes da realização das análises moleculares e da compilação dos dados clínicos. Nenhuma reavaliação histológica foi feita após a análise dos resultados do estudo. Portanto, eventuais incongruências como esta, mesmo em uma situação controlada de estudo clínico, apenas reforçam os desafios enfrentados na prática clínica.

Em relação à classificação de Lauren, o subtipo intestinal tem sido o mais prevalente historicamente, mas com tendência de queda em incidência ao longo das últimas décadas. Enquanto isso, a incidência do subtipo difuso aparentemente vem aumentando. No período entre 1973-2000, nos EUA, a incidência do tipo difuso cresceu de 0,3 para 1,8 casos por 100.000 habitantes, principalmente às custas do aumento nos casos de AdG em anel de sinete (HENSON et al. 2004). Essa elevação na incidência do AdG-D também é descrita em países asiáticos. Ikeda et al. relataram que no Japão, entre 1971 e 1990, o percentual de AdG inicial com subtipo difuso aumentou de 34,7% para 39,3%. Além disso, o percentual de AdG avançado com subtipo difuso aumentou de 52% para 63,1% no mesmo período (IKEDA et al. 1995). Na Espanha, o grupo AGAMENON descreveu uma coorte de 1303 pacientes com AdG Her2 negativos, 95% dos quais metastáticos ao diagnóstico. Metade dos casos (652/1303) foi classificada como tipo difuso de Lauren e 37% (482/1303) foi classificada como tipo intestinal.

Na nossa casuística, com casos diagnosticados entre 2001 e 2012, a predominância foi de AdG-D (47,3%; 53/112). Também no A.C. Camargo Cancer Center, em uma casuística um pouco mais antiga, o Dr. Wilson Costa e colaboradores publicaram uma casuística de 413 pacientes com

AdG operados entre 1988 e 2011, reportando 49% de AdG-I e 42% de AdG-D (DA COSTA et al. 2015). Em outra casuística do A.C. Camargo Cancer Center com 46 pacientes recrutados prospectivamente entre 2015 e 2016, também observamos uma predominância de AdG-D (56,5%; 26/46) (PIZZI et al. 2019). Essa tendência maior prevalência de AdG-D se manteve em uma casuística mais ampla e recente, obtida dentro de projeto temático ainda em curso em nosso grupo. Nesta casuística de 220 pacientes obtivemos 51,4% de AdG-D (n: 113), 39,1% de AdG-I (n: 86) e 9,5% de AdG-M (n: 21) (dados não publicados).

Os tumores proximais vem crescendo em incidência, especialmente em países ocidentais, desde a década de 1970. Nos EUA e na Europa, metade dos AdG atualmente localiza-se na TEG (CREW e NEUGUT 2006). Em nosso trabalho, apenas 13 pacientes (11,6%) tinham tumores proximais, localizados na TEG. A maioria dos tumores estava localizada no corpo (50%; 56/112) e no antro (30,4%; 34/112). Sete casos (6,2%) tinham tumor na forma de linite.

Nossa coorte foi construída a partir da disponibilidade de material no biobanco. Portanto, ela carrega o viés de ter incluído em sua totalidade casos que foram submetidos a ressecções cirúrgicas. Apenas um caso não foi submetido a cirurgia. Dezesesseis casos (14,3%) tinham EC IV ao diagnóstico e aparentemente a constatação da presença de metástases foi feita apenas na cirurgia, em uma época em que videolaparoscopia estadiadora ainda não era parte da rotina.

## **5.1 SOBREVIDA E FATORES CLÍNICOS**

O tempo mediano de seguimento dos casos estudados foi 95 meses. Essa é uma das forças do nosso estudo, pois este longo período permite obter curvas de sobrevida bastante maduras. No entanto, não foi realizada avaliação da sobrevida doença-específica. Essa é uma das limitações do estudo, pois pacientes com idade mediana de 64 anos ao diagnóstico, tem significativa probabilidade de falecimento por causas naturais ou outras

causas não relacionadas ao câncer uma década mais tarde. Desta maneira, a proporção real de pacientes curados pode estar subestimada.

A SG mediana nesta coorte de pacientes foi 81 meses e a SG em 5 anos foi 62,6% (IC95% 51,7%-71,7%). Esses números são muito superiores ao rotineiramente descrito na literatura ocidental e aproximam-se do observado no Japão. Nos EUA e no Reino Unido, a SG em 5 anos é inferior a 20% (CANCER RESEARCH UK [s.d.]; CREW e NEUGUT 2006). No Japão, uma análise recente da sobrevida de 118.367 pacientes com AdG operados entre 2001 e 2007, demonstrou 71,1% de SG em 5 anos. Essa casuística representa 15% de todos os pacientes diagnosticados com AdG no Japão no período e tinha uma forte predominância de EC I (58,7%), com apenas 12,4% de casos metastáticos ao diagnóstico (KATAI et al. 2018). No A.C. Camargo Cancer Center, a casuística de DA COSTA (2015), com 413 pacientes com AdG operados no A.C. Camargo Cancer Center, relatou uma SG em 5 anos de 49,2%.

Vinte e cinco pacientes da coorte (22,3%) tinham EC I. Nesse grupo, a SG e a SLD em 5 anos foram, respectivamente, 96% (IC95% 88-100) e 87% (IC95% 65-96). Esse é um grupo com prognóstico muito bom e alta probabilidade de cura e nitidamente contribuiu para os bons desfechos de sobrevida nessa coorte.

Contudo, mais da metade dos casos tinham EC III (48/112; 42,8%) ou EC IV (16/112; 14,3%), grupos com prognóstico bem pior. Ainda assim, a SG mediana observada nos casos EC IV foi 22 meses, mais que o dobro da SG usualmente reportada no Ocidente, em geral com mediana inferior a 12 meses (CUNNINGHAM et al. 2008; JIMÉNEZ FONSECA et al. 2017). Nesse grupo, a SG em 5 anos foi 37% (IC95% 18-75), muito acima até da sobrevida de casos EC IV no Japão (17%; IC95% 16-18) (KATAI et al. 2018).

Além das análises clínicas, nossa intenção principal foi avaliar o perfil mutacional e o impacto prognóstico das alterações moleculares. Os casos EC IV, embora informativos quanto ao perfil mutacional dos tumores e ancestralidade, estavam disponíveis em menor número no Biobanco, que

concentra amostras coletadas no centro cirúrgico. Com um número reduzido de casos metastáticos, as análises de subgrupo nesse casos EC IV seriam meramente descritivas. Por isso, nosso banco de dados não incluiu informações sobre o tratamento sistêmico destes pacientes. Pretendemos, como extensão a esse projeto, ampliar as análises na população de pacientes com AdG metastático tratada no A.C. Camargo Cancer Center.

O sexo e a idade dos pacientes ao diagnóstico não mostraram influenciar os desfechos de sobrevida (Figura 7). Da mesma maneira, não identificamos associação entre a localização dos tumores e a SG dos pacientes. Contudo, apesar do número reduzido ( $n=13$ ), os pacientes com tumores na TEG apresentaram SLD inferior aos casos com tumores distais (18,5m x 78m, respectivamente;  $p=0,007$ ) (Figura 8). Essa associação se manteve na análise multivariada com ajuste para o estadiamento ( $p=0,029$ ), em linha com a descrição de pior prognóstico dos tumores em TEG descrita na literatura ocidental (COUPLAND et al. 2012; PISO et al. 2000).

Em nosso estudo, não observamos associação entre o tipo histológico e os desfechos de sobrevida. A literatura descreve que a variante AdG-SI está associada a diferenciação pobre e a estadiamento avançado, mas seu impacto prognóstico é controverso (POSTLEWAIT et al. 2015). Na nossa coorte, não houve impacto prognóstico associado à presença de componente em anel de sinete. De fato, o subgrupo com AdG-SI classificado também como Lauren não-difuso apresentou sobrevida numericamente menor do que o grupo com AdG-SI difuso, embora sem significância estatística (66 meses x 87 meses, respectivamente; HR 0,73; IC95% 0,27-1,96;  $p=0,5$ ) (Figura 10).

Na comparação direta das características clínicas entre os AdG-SI difusos e não-difusos observamos diferença estatisticamente significativa (marginalmente) quanto ao estadiamento ao diagnóstico ( $p=0,045$ ). Entre os AdG-SI não-difuso havia 1 caso EC IIB e 8 casos IIIC. Já os 21 AdG-SI difusos distribuíram-se em todos os estádios, incluindo 4 casos EC IV. Portanto, a menor SG nos AdG-SI não-difusos não deve ser atribuível apenas ao estadiamento.

Não observamos diferenças relevantes em outras variáveis clínicas analisadas (sexo, idade, EBV), mas quanto à carga mutacional, observamos uma maior média de mutações por tumor nos AdG-SI não-difusos (15 x 4). Provavelmente devido ao pequeno número de casos, a diferença não atingiu significância estatística ( $p=0,2$ ).

Os 12 casos de AdG-T apresentaram a pior mediana de SG entre todas as histologias (51 meses; IC95% 37-99), com uma diferença de 33 meses em relação às demais histologias analisadas conjuntamente (84 meses; IC95% 75-99). O AdG-T usualmente é associado ao tipo intestinal de Lauren (YU et al. 2017). Na nossa coorte, 8 AdG-T foram também classificados como intestinais, 3 casos como difusos e 1 caso como inclassificável pela classificação de Lauren. Além disso, em 2 casos (17%) houve perda de seguimento precoce, sem nenhuma visita de acompanhamento registrada após a cirurgia. Por esses motivos, a SG inferior neste grupo deve ser interpretada com cautela.

Historicamente, o tipo histológico de Lauren tem sido associado ao prognóstico de pacientes com AdG. Um estudo Japonês relatou uma análise de 118.367 pacientes com AdG operados, descrevendo SG em 5 anos de 76% (IC 95% 75-76) para os AdG-I, 67% (IC95% 66-67) para os AdG-D e 47% (IC95% 43-50) para os demais casos ( $p<0,001$ ) (KATAI et al. 2018). O grupo Espanhol AGAMENON descreveu SG mediana de 11 meses para os AdG-I (IC 95% 10,3-12,1), 9,3 meses para os AdG-D (IC95% 8,3-10,3) e 10,1 meses para os AdG-INC (iC95% 8,5-11,1). A diferença de SG entre os grupos foi estatisticamente significativa ( $p=0,021$ ). Uma recente meta-análise de 73 estudos envolvendo 61.468 pacientes com AdG também descreveu pior prognóstico para pacientes com AdG-D, tanto nos casos com doença localizada (HR 1,21; IC95% 1,12-1,30;  $p<0,0001$ ) como nos casos com doença metastática (HR 1,25; IC95%, 1,05-1,50;  $p=0,014$ ) (PETRELLI et al. 2017).

Na nossa casuística, SG em 5 anos para os AdG-I foi 54,7% (IC95% 41-73;  $n=46$ ) e para os AdG-D foi 65% (IC95% 52-81;  $n=53$ ). Comparando AdG-I com AdG-D, observamos que nos casos não-metastáticos a mediana

de SG nos AdG-D (83 meses; IC95% 75-99; n=38) foi numericamente maior do que nos AdG-I (67 meses; IC95% 51-110; n=44), com HR 0,92 (IC95% 0,54-1,59; p=0,79). Já nos casos metastáticos, a relação foi inversa, com pior SG nos AdG-D (23 meses x 15 meses; HR 0,88; IC95% 0,24-3,14; p=0,8).

Portanto, nossa coorte tinha uma alta proporção de AdG-D (47%) e estes casos não apresentaram prognóstico pior do que os AdG-I como referido na literatura. Diferenças no estadiamento não parecem justificar esse achado, pois a distribuição dos casos com AdG-D e AdG-I de acordo com estágio clínico foi equilibrada (p=0,98). Apesar de incluir 58% (31/53) de estádios III e IV, o grupo com AdG-D apresentou SG em 5 anos superior à relatada para o mesmo subtipo na casuística japonesa (65% x 47%) (KATAI et al. 2018). O prognóstico dos AdG-D em nossa casuística foi pior que dos AdG-I apenas nos casos metastáticos, embora sem significância estatística. Ainda assim, a mediana de 15 meses de SG para os AdG-D metastáticos foi consideravelmente maior que o reportado para AdG metastático na literatura (CUNNINGHAM et al. 2008; JIMÉNEZ FONSECA et al. 2017).

## 5.2 PERFIL MUTACIONAL DOS TUMORES

Os genes que compõem o painel utilizado neste trabalho foram selecionados com base em estudos exploratórios prévios (KAKIUCHI et al. 2014; THE CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK 2014; WANG et al. 2014). Nosso objetivo foi descrever o perfil mutacional e avaliar o impacto prognóstico das mutações observadas nos AdG em uma coorte de pacientes tratados no A.C. Camargo Cancer Center. Do nosso conhecimento, esta é a caracterização clínico-molecular mais ampla já realizada em pacientes brasileiros com AdG até o momento.

Os filtros que estabelecemos para a chamada de variantes visaram minimizar a inclusão de variantes germinativas nas análises do perfil mutacional tumoral. A média de 8 mutações por amostra em nossa coorte é maior que a observada na análise do TCGA focada apenas nos mesmos

genes do painel de captura usado neste estudo (Figura 14). Esse achado é justificável pelo uso de um painel de captura direcionado a um número limitado de genes, que permite uma alta cobertura vertical, em comparação ao sequenciamento do exoma completo realizada no TCGA. A cobertura média em nosso estudo foi 706x, com 95% das bases atingindo cobertura mínima de 100x. Não conseguimos obter a informação sobre a cobertura do sequenciamento nas análises do TCGA para AdG, mas é razoável supor que a cobertura vertical média foi inferior a 100x.

As FMs observadas em nosso estudo, de maneira geral, parecem maiores do que as descritas para AdG no COSMIC e no TCGA (Tabela 6). Pelo menos em parte, isso pode ser justificado pelo direcionamento desse projeto a genes específicos, com o uso de um painel de captura focado em genes sabidamente mutados em AdG e com alta cobertura vertical média (706x), o que permite detectar mutações mais raras dentro de um dado tumor. Ainda assim, para alguns genes como *TP53*, *FAT4* e *SPTA1*, a FM na nossa coorte (30%, 17% e 12%, respectivamente) foi muito semelhante àquela descrita no COSMIC (34%, 13% e 13%, respectivamente) e no TCGA (32%, 15% e 10%, respectivamente).

Alguns dos genes presentes entre os mais mutados na nossa coorte foram estudados por outros grupos recentemente quanto ao impacto prognóstico. A seguir, discutiremos os achados relativos a alguns desses genes:

*FAT4* (*Fat atypical cadherin 4*) é um gene supressor tumoral da família das caderinas que ação supressora sobre o crescimento e invasão em câncer de mama e no AdG. Um estudo recente associou a perda de expressão de *FAT4* causada por metilação na sua região promotora a um pior prognóstico em pacientes com AdG (JIANG et al. 2018). Na nossa casuística, *FAT4* mostrou-se preferencialmente mutado entre os AdG-I e também nos casos com CMT-A. A presença de mutações em *FAT4* não impactou no prognóstico dos pacientes (HR 0,83; IC95% 0,39-1,75; p=0,6). Esse trabalho não incluiu análise de expressão gênica ou de metilação, estratégias que estão em nossos planos para análises futuras.

*BRCA1* e *BRCA2* (*breast cancer susceptibility genes 1 and 2*) são genes supressores envolvidos no controle de danos e no reparo do DNA. Mutações em *BRCA2* tem sido descritas em AdG, mas curiosamente as principais coortes não tem descrito mutações somáticas em *BRCA1* (CHEN et al. 2015; THE CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK 2014; WANG et al. 2014). O COSMIC relata mutações em *BRCA1* em 2,5% dos AdG (31/1204). Em nossa coorte, o painel não incluiu *BRCA1* e nos casos com exoma completo sequenciado não foram identificadas mutações neste gene.

Para o gene *BRCA2*, a FM em nossa coorte (14%) foi 2,5x mais alta do que no COSMIC e no TCGA (4% em ambos). *BRCA2* foi descrito com FM 8% em um estudo que realizou WES em 78 AdG de pacientes chineses (CHEN et al. 2015). É interessante observar que em nossa coorte identificamos uma predominância de *BRCA2* mutado no subgrupo com AP asiática em comparação às demais ancestralidades (29% x 9%;  $p=0,009$ ; FDR=1).

No estudo chinês que realizou WES em 78 AdG, os autores observaram que *BRCA2* mutado esteve associado a maior SG em relação àqueles sem mutação no gene, mas sem significância estatística. Os autores realizaram uma segunda análise agregando esses casos com a coorte do TCGA ( $n= 569$ ) e observaram a associação de *BRCA2* mutado com maior SG de maneira estatisticamente significativa ( $p=0,03$ ). Após ajuste para idade, estágio, grau de diferenciação e tipo de população, *BRCA2* mutado manteve-se como um fator de bom prognóstico (HR= 0,37; IC95% 0,13-0,96;  $p=0,05$ ) (CHEN et al. 2015).

Na nossa coorte tivemos um achado distinto. Os casos com *BRCA2* mutado apresentaram SG mediana inferior, embora sem significância estatística (44 meses x 83 meses;  $p=0,35$ ). A menor SG no grupo com mutação em *BRCA2* pode ser justificada, pelo menos em parte, pelo desequilíbrio no estadiamento ao diagnóstico entre os dois grupos. Apenas 10,4% dos casos *BRCA2*-wt apresentaram EC IV em comparação a 37,5% nos casos com mutação em *BRCA2* ( $p=0,02$ ).

No entanto, na nossa coorte os casos com mutação de *BRCA2* também apresentaram mediana de SLD numericamente inferior (38 meses x 71 meses), com HR 1,28 (IC 95% 0,6-2,7; p=0,52). Embora sem significância estatística, essa diferença de 33 meses é clinicamente significativa. Como a análise de SLD exclui os casos metastáticos, não é possível atribuir essa diferença à maior proporção de casos metastáticos entre os indivíduos com *BRCA2* mutado. Devido ao tamanho relativamente pequeno da nossa coorte e ao pequeno número de casos com mutação em *BRCA2* (n=16), esse achado deve ser considerado com cautela e ainda carece de validação posterior. Planejamos avaliar o impacto prognóstico de *BRCA2* em outra coorte atualmente em recrutamento. Além disso, mutações germinativas em *BRCA2* estão associadas ao desenvolvimento de diversos tipos de câncer, como mama, pâncreas, ovário e estômago. Um estudo polonês inclusive indicou que a presença de câncer de ovário e AdG na mesma família é um preditor da presença de mutação germinativa em *BRCA2* (JAKUBOWSKA et al. 2003). Nosso estudo não incluiu pareamento tumor-tecido normal, só obtivemos DNA de leucócitos de 16 casos e o histórico familiar de câncer disponível nos prontuários dos pacientes não contempla informações detalhadas na maioria dos casos. Portanto, apesar da boa cobertura obtida e da estringência dos diversos filtros aplicados, não é possível descartar completamente a presença de mutações germinativas entre as variantes encontradas.

Outro gene importante no contexto do AdG é *PIK3CA*. Na coorte do TCGA (n=427), 11% dos casos tinham mutação em *PIK3CA*. O COSMIC relata FM 10% para este gene. Na nossa coorte, menos de 4% das amostras tinham mutação em *PIK3CA*. A baixa FM neste gene, em parte, deve-se ao filtro aplicado para excluir variantes em regiões duplicadas do genoma e regiões de TR, que não sabemos informar se foram aplicadas a outras coortes. Após a aplicação desse filtro, excluimos as variantes anotadas nos éxons 10, 11, 12, 13 e 14 de *PIK3CA*, resultando em exclusão de 4 variantes das análises, 3 delas no éxon 10 (p.E545G, p.E545Q e p.Q546K) e uma no éxon 14 (p.E726K). Variantes que afetam os códons 545

e 546 estão presentes na coorte do TCGA (p.E545K, p.Q546H) e as variantes p.E726K e p.Q546K foram descritas no estudo chinês citado acima (CHEN et al. 2015). Contudo, mesmo incluindo essas variantes, a FM de *PIK3CA* subiu de 3,6% para 6,3%, ainda inferior ao descrito na literatura. Outro provável fator que explica essa menor FM é a baixa representatividade de casos EBV positivos na nossa coorte (n=5). No TCGA, 80% dos casos EBV positivos apresentaram variantes em *PIK3CA*.

WANG et al. (2011) descreveram pela primeira vez o envolvimento de genes funcionalmente ligados à remodelação de cromatina no AdG. Os autores realizaram WES em amostras tumorais de 22 casos com AdG. Dentre os genes avaliados, mutações em *ARID1A* foram detectadas em 83% dos casos com MSI, em 73% dos casos com EBV positivo e em apenas 11% dos casos EBV negativos e MSS (*microsatellite stable*). Na nossa casuística, *ARID1A* foi o 3º gene com maior FM (19%). Os casos desta coorte não foram avaliados quando à MSI, mas é interessante observar que 8/12 casos com CMT-A (67%) tinham variantes em *ARID1A* em contraste com apenas 3/58 casos com CMT-B (5%). Além disso, 2 dos 5 casos com EBV positivo tinham mutações em *ARID1A* (40%).

*ARID1A* (*AT-rich interactive domain 1A gene*) é um gene supressor tumoral e um componente vital do complexo de remodelação de cromatina SWI/SNF (*Switch/Sucrose Non Fermentable*). A maioria das mutações em *ARID1A* em vários tipos de câncer leva à perda de expressão da proteína (YANG et al. 2016). Uma meta-análise de 14 estudos envolvendo 3183 pacientes com AdG demonstrou que *ARID1A* mutado está associado a prognóstico adverso (HR 1,60; IC95% 1,40-1,81; p<0,001). Dos 14 estudos avaliados, apenas 3 (n=319 casos) recrutaram pacientes não-asiáticos. E entre os não-asiáticos, *ARID1A* mutado não esteve associado a pior sobrevida (HR 1,50; IC95% 0,53-4,20; p=0,444).

Na nossa casuística, *ARID1A* foi um dos genes mais frequentemente mutados mas não esteve associado a pior SG (HR 1,17; IC95% 0,59-2,31; p=0,7) ou pior SLD (HR 1,24; IC95% 0,66-2,32; p=0,5). Mesmo quando analisamos *ARID1A* nos 31 casos com AP asiática, não observamos

associação com SG inferior (HR 1,08; IC95% 0,31-3,81; p=0,9) ou SLD (HR 1,15; IC95% 0,32-4,1; p=0,8).

*RHOA* (*Ras homolog family member A*) pertence a um grupo de pequenas GTPases com funções relacionadas a migração celular, organização de actina, citocinese e regulação do ciclo celular (KAKIUCHI et al. 2014). Mutações em *RHOA* vem sendo descritas nos últimos anos no AdG. Na coorte do TCGA (n=427), *RHOA* apresenta mutações em apenas 3,5% dos casos. No COSMIC, a FM descrita para *RHOA* é 5,1% (95/1844).

KAKIUCHI et al. (2014) relataram alta FM de *RHOA* e foram os primeiros a sugerir que esse gene está mutado preferencialmente nos AdG-D. Nessa análise, inicialmente os autores realizaram WES de 30 AdG-D. Posteriormente, avaliaram outros 57 AdG-D e 51 AdG-I com um painel de captura incluindo *RHOA* e outros 26 genes. Eles descreveram FM de 25,3% (22/87) nos AdG-D e não encontraram nenhuma mutação em *RHOA* nos 51 AdG-I.

No COSMIC, a FM de *RHOA* nos AdG-D é 13% (39/312) e nos AdG-I é 1,8% (7/397). Na coorte do TCGA (n=427) a FM de *RHOA* foi 3,5%, com 2,7% dos AdG-I (n=188) e 3,2% dos AdG-D (n=63) apresentando mutações nesse gene.

Nossa casuística demonstrou achados mais parecidos com os do TCGA, com os 8 casos com mutação em *RHOA* distribuindo-se por todos os subtipos de Lauren. Três deles eram AdG-D, 3 eram AdG-I, um caso era misto e o outro foi considerado inclassificável. Portanto, a FM de *RHOA* foi 5,7% (3/53) nos AdG-D e 6,5% (3/46) nos AdG-I. Se considerarmos que a mutação de *RHOA* no caso com tipo misto estivesse no componente difuso, a FM de *RHOA* aumentaria para 7,5%, ainda assim sem uma clara predominância em AdG-D como descrito em outras coortes.

Quanto à ancestralidade, 6/8 casos (75%) com mutação em *RHOA* tiveram AP europeia e 2/8 (25%) casos tiveram AP asiática. Nenhum caso com AP africana ou altamente miscigenada apresentou mutações em *RHOA*. A FM de *RHOA* nos casos com AP europeia foi 9,7% (6/62) e naqueles com AP asiática foi 6,5% (2/31).

Os principais *hotspots* mutacionais descritos em *RHOA* afetam os resíduos de tirosina no códon 42 (Tyr42), arginina no códon 5 (Arg5) e glicina no códon 17 (Gly17) (KAKIUCHI et al. 2014). Na nossa coorte, 3 dos 8 casos com mutação em *RHOA* tinham mutações nesses *hotspots* e todos eles eram AdG-D. Portanto, apesar de não haver uma predominância de mutações em *RHOA* nos ADG-D em nossa coorte, todas as mutações encontradas nos principais *hotspots* ficaram restritas aos AdG-D.

Poucos estudos avaliaram o impacto prognóstico de *RHOA* mutado no AdG. CHEN et al. (2014) relataram não ter encontrado associação de *RHOA* com a sobrevida em uma análise de pacientes chineses com AdG. ROCKEN et al. (2016) também não encontraram associação de *RHOA* mutado com prognóstico em uma coorte de 415 pacientes com AdG oriundos da Europa Central.

CHANG et al. (2016) avaliaram a imunexpressão de *RHOA* fosforilado em 265 pacientes com AdG ressecados (136 AdG-D e 129 AdG-I). A proteína *RHOA* fosforilada está associada a Rho-GDI, uma chaperona que sequestra *RHOA* no citosol em seu estado inativo. Portanto, pesquisar *RHOA* fosforilado por imunistoquímica significa identificar a forma inativa da proteína. Os autores relataram atividade alta de *RHOA* em 54,4% dos AdG-D e em 45,7% dos AdG-I. Nos AdG-D, alta atividade de *RHOA* associou-se com pior SG em 5 anos (52,5% x 81%;  $p=0,017$ ), efeito não observado entre os AdG-I (83,9% x 81,6%;  $p=0,766$ ). Alta atividade de *RHOA* nos AdG-D mostrou-se um fator prognóstico adverso na análise multivariada (HR 2,38; IC95% 1,07-5,28).

O mesmo grupo avaliou a atividade de *RHOA in vitro* e observou uma capacidade de migração e invasão aumentada, *RHOA* dependente, em células de AdG-D. Além disso, os autores conseguiram reverter a resistência dos esferoides de AdG-D a Fluorouracil e Cisplatina através de inibição da via *RHOA*. Portanto, além de aumentar a capacidade de invasão e migração de células tumorais, *RHOA* também representaria um fator de resistência à quimioterapia (YOON et al. 2016).

Na nossa coorte, observamos que os casos com mutação de *RHOA* apresentaram melhor evolução clínica. Neles, a SG mediana foi 125 meses (IC95% 125-NA) em comparação a 78 meses nos demais casos (IC95% 57-86) uma diferença clinicamente relevante e estatisticamente significativa ( $p=0,015$ ; HR 0,13; IC95% 0,018-0,92). De maneira análoga, a SLD foi maior no subgrupo com mutação de *RHOA* (125 meses x 66 meses;  $p=0,041$ ; HR 0,25 IC95% 0,06-1,05) (Figura 34). Esse achado não se justifica por desequilíbrios na distribuição de estadiamento dos casos, pois seis (75%) dos 8 casos com mutação de *RHOA* apresentaram-se como estádios III ou IV e apenas dois apresentaram EC I.

Não identificamos outras descrições com achado semelhante ao nosso na literatura. De certa forma, é intuitivo inferir que mutações que confirmam maior atividade em *RHOA* estejam associadas a maior agressividade da doença, com tumores mais invasivos, o que torna nosso achado intrigante. Devido ao número reduzido de casos em nossa coorte com mutação de *RHOA*, não foi possível avaliar, por exemplo, se *RHOA* mutado teria efeito prognóstico distinto em tumores iniciais e metastáticos. Nesses últimos, o aumento da atividade de *RHOA* poderia implicar em resistência a Fluorouracil e Cisplatina, duas drogas centrais no tratamento com AdG. Planejamos validar esse achado em outra coorte prospectiva atualmente em recrutamento.

### **5.2.1 Idade ao diagnóstico (<50 anos x ≥50 anos)**

Em nossa coorte de estudo, 23% dos pacientes foram diagnosticados em uma faixa etária pelo menos quinze anos mais jovem que a média. Os motivos que levam uma pessoa a desenvolver um câncer em faixa etária muito inferior à esperada ainda precisam ser esclarecidos e está além do escopo deste trabalho discuti-los. A própria definição de idade mais jovem para o diagnóstico de AdG é variável (<40 ou <45 anos) e não há um consenso. Neste estudo, a idade limite foi definida como 49 anos a partir da equação: média de idade ao diagnóstico -1DP. Nosso interesse foi investigar se o grupo de pacientes com idade mais jovem (<50 anos) apresentava

características clínicas, prognóstico e/ou perfil molecular do tumor distintos dos pacientes mais velhos ( $\geq 50$  anos).

Observamos uma clara predominância de AdG-D entre os mais jovens ( $p=0,002$ ); dos 23 casos abaixo de 50 anos, 60,9% (14/23) foram AdG-D e apenas 13% (3/23) foram AdG-I. Observamos ainda uma maior proporção de AdG-SI entre os mais jovens ( $p=0,017$ ). De fato, 40% dos 30 tumores AdG-SI ocorreram em pacientes abaixo de 50 anos. Esses achados estão em linha com uma meta-análise que avaliou 9 artigos publicados entre 1989 e 2009, englobando dados de 10.524 pacientes com AdG (KONG et al. 2012), usando a linha de corte de 45 anos para definição de casos mais jovens. Os autores também observaram uma predominância de AdG pouco diferenciado (que inclui o AdG-D pela classificação japonesa) e de AdG-SI entre os mais jovens.

Quase todos os casos mais jovens em nossa coorte apresentaram doença localmente avançada, com 91,3% deles distribuindo-se entre os estádios II (30,4%) e III (60,9%). Apenas dois casos (8,7%) apresentaram doença metastática ao diagnóstico. Mas a idade ao diagnóstico ( $<50$  anos x  $\geq 50$  anos) não influenciou os desfechos de sobrevida em nossa coorte. A SG mediana observada nos casos abaixo de 50 anos foi 75 meses (IC95% 40-NA) e naqueles  $\geq 50$  anos foi 83 meses (IC95% 66-99), com HR 1,11 (IC95% 0,6-2,05;  $p=0,74$ ). Por sua vez, a SLD mediana nos pacientes mais jovens foi 68 meses (IC95% 34-NA) e 71 meses (IC95% 44-85) nos casos acima de 50 anos, sem significância estatística (HR 1,09; IC 0,6-1,96;  $p=0,78$ ) (Figura 7). Na meta-análise de KONG et al. (2012), os casos abaixo de 45 anos apresentaram melhor prognóstico, com SG em 5 anos de 53% em comparação a 43% nos pacientes acima de 45 anos (OR 1.32; IC95% 1,06-1,66;  $p=0,01$ ).

Quanto ao perfil mutacional dos tumores, nos casos mais jovens observamos uma menor média de mutações por amostra (3,5 x 9;  $p=0,0001$ ) e uma menor relação NS/S (1,64 x 4,34;  $p=0,0001$ ). Na análise dos exomas ( $n=24$ , 6 casos  $<50$  anos), a média de mutações nos casos  $<50$  anos também foi menor do que nos casos  $\geq 50$  anos, embora sem significância

estatística (75 x 292, respectivamente;  $p=0,23$ ). Já a relação NS/S foi bem próxima nos dois grupos, mas um pouco maior no grupo <50 anos (3,22 x 2,78, respectivamente;  $p=0,16$ ).

Na análise que fizemos do TCGA ( $n=443$ , 32 casos <50 anos), não observamos diferenças significativas na média de mutações por tumor (6 x 5, respectivamente) e não houve genes diferencialmente mutados de acordo com a faixa etária quando avaliamos apenas os mesmos 99 genes do painel. Contudo, ao ampliarmos a análise para todos os genes, as diferenças surgem entre os grupos etários de maneira oposta ao observado em nossa coorte. A média de mutações no grupo <50 anos foi 211 versus 178 para o grupo  $\geq 50$  anos ( $p<0,001$ ) e a relação NS/S foi 3,42 e 2,53, respectivamente ( $p<0,0001$ ).

A discrepância na média de mutações entre os grupos <50 anos x  $\geq 50$  anos entre a nossa coorte e o TCGA talvez se justifique por diferenças no perfil clínico dos casos nas duas coortes. No TCGA, por exemplo, apenas 37,5% (12/32) dos casos <50 anos eram AdG-D em comparação a 60,9% (14/23) em nossa coorte. Como mencionado previamente neste estudo, a CMT dos AdG-D é menor que a dos AdG-I.

Entre os pacientes <50 anos observamos menor FM em genes comumente mutados em AdG e não detectamos enriquecimento de mutações em genes específicos (Figura 16).

Observamos que *TP53*, um importante driver que tem sido descrito entre os genes mais frequentemente mutados em AdG (THE CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK 2014; WANG et al. 2014), não esteve entre os genes mais mutados nos pacientes mais jovens na nossa coorte. A FM de *TP53* foi 9% nos casos <50 anos e 36% nos casos  $\geq 50$  anos ( $p<0,05$ ; FDR 0,94) (Figura 16). Esse achado confirma outro estudo do A.C. Camargo Cancer Center em que os autores, analisando 88 casos de AdG em pacientes  $\leq 45$  anos, relataram a presença de mutações em *TP53* em apenas 14,5% dos tumores. Nesse estudo, 70% dos tumores era AdG-D (SILVA et al. 2013). Portanto, *TP53* não parece ser um *driver* determinante no AdG em pacientes jovens.

### 5.2.2 Localização do tumor

Nesta coorte, observamos algumas diferenças entre os genes mais mutados de acordo com a localização dos tumores. Entre os 10 genes mais mutados nos tumores da TEG apenas 5 coincidiram com os genes mais mutados em tumores do corpo gástrico (*TP53*, *PKHD1*, *ARID1A*, *FAT4* e *ATM*), apenas 3 coincidiram com os genes mais mutados em tumores de antro (*TP53*, *KMT2C* e *FAT4*) e apenas 1 coincidiu com os genes mais mutados em tumores na forma de linite (*ARID1A*) (Figura 18).

Contudo, apesar das FM discrepantes, só observamos genes significativamente mais mutados na TEG (*EGFR*;  $p=0,02$ ; FDR 0,47) e no antro: *RPL22* ( $p<0,001$ ; FDR 0,25), *ACVR2A* ( $p<0,01$ ; FDR 0,25), *BCORL1* ( $p<0,01$ ; FDR 0,25), *TGFBR2* ( $p<0,01$ ; FDR 0,27), *ZBTB20* ( $p<0,01$ ; FDR 0,3), *FRMD4A* ( $p<0,01$ ; FDR 0,3), *GPR124* ( $p<0,01$ ; FDR 0,3), *KRAS* ( $p<0,01$ ; FDR 0,3), *RNF43* ( $p<0,05$ ; FDR 0,3), *APC* ( $p<0,01$ ; FDR 0,45), *KMT2C* ( $p<0,01$ ; FDR 0,66), *ALPK2* ( $p<0,01$ ; FDR 0,83) (Figura 19B).

Nossa coorte tinha baixa representatividade de tumores da TEG, portanto, as conclusões sobre o perfil mutacional neste grupo são mais limitadas. Comparando com a coorte do TCGA, *EGFR* não figurou na lista de genes preferencialmente mutados nos tumores de TEG quando consideramos o exoma completo (*CDKN2A*, *MS4A13*, *C20orf195*, *ADGRE2*, *GP5*, *OR10X1*, *FMN2*, *GRM1*, *TP53*, *CLSTN3*, *KIF2B*, *NBEA*). O mesmo aconteceu quando avaliamos no TCGA apenas os genes do nosso painel. Novamente, *EGFR* não esteve na lista de genes preferencialmente mutados nos tumores de TEG na coorte do TCGA (*TP53* e *KIF2B*). Nos tumores de antro, na nossa coorte e no TCGA observamos enriquecimento para mutações em *KMT2C* e *ZBTB20*.

*KMT2C* (*Lysine Methyltransferase 2C*) é uma metiltransferase de histonas que foi recentemente descrito como o gene mais mutado (FM 41%) em uma coorte de 27 pacientes ocidentais cujos tumores foram avaliados com WES (CHO et al. 2018). Na nossa coorte, a FM de *KMT2C* foi 15% e no subgrupo com AdG-D a FM de *KMT2C* foi 14%. No TCGA, a FM de *KMT2C* foi 7% e nos ADG-D do TCGA a FM desse gene foi 6%.

*ZBTB20* foi um dos genes com alta FM (24%) entre os casos hipermutados do TCGA (THE CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK 2014). Além disso, o polimorfismo rs9841504 no locus 3q13.31 do gene *ZBTB20* (*Zinc Finger And BTB Domain Containing 20*) foi descrito como um locus de suscetibilidade para AdG distal (SHI et al. 2011). Além disso, na nossa coorte não identificamos o polimorfismo rs9841504 mesmo analisando a chamada sem os filtros de variantes.

### 5.2.3 Tipo histológico

Analisando o tipo histológico dos tumores de acordo com a classificação da OMS, observamos padrões mutacionais distintos entre os AdG-T. Os genes preferencialmente mutados neste grupo de tumores foram: *ALPK2* ( $p < 0,01$ ; FDR 0,29), *RPL22* ( $p < 0,01$ ; FDR 0,31), *FRMD4A* ( $p < 0,01$ ; FDR 0,31), *ACVR2A* ( $p < 0,01$ ; FDR 0,31), *ARID1A* ( $p < 0,01$ ; FDR 0,49), *TGFBR2* ( $p < 0,05$ ; FDR 0,52), *KRAS* ( $p < 0,05$ ; FDR 0,52), *BCORL1* ( $p < 0,05$ ; FDR 0,52), *MACF1* ( $p < 0,05$ ; FDR 0,52), *PALB2* ( $p < 0,05$ ; FDR 0,67) e *GPR124* ( $p < 0,05$ ; FDR 0,91).

Apesar de 8 dos 12 AdG-T também terem sido classificados como AdG-I, dos genes preferencialmente mutados nos AdG-T apenas *ACVR2A* e *RPL22* se sobrepõem à lista dos genes preferencialmente mutados nos AdG-I, que foram os seguintes: *TP53* ( $p < 0,001$ ; FDR=0,037), *LARPB4* ( $p < 0,01$ ; FDR=0,4), *ACVR2A* ( $p < 0,01$ ; FDR=0,43), *FAT4* ( $p < 0,01$ ; FDR=0,43), *RPL22* ( $p < 0,05$ ; FDR=0,46), *PKHD1* ( $p < 0,05$ ; FDR=0,48), *GLI3* ( $p < 0,05$ ; FDR=0,52) e *RNF43* ( $p < 0,05$ ; FDR=0,52).

As diferenças no perfil de genes mais mutados entre AdG-T e AdG-I podem eventualmente refletir incongruências na classificação histológica dos casos a despeito da revisão por patologista único e experiente. Contudo, AdG tubular e AdG papilífero representam subtipos histológicos distintos na classificação da OMS e ambos se correlacionam com o subtipo intestinal de Lauren (YU et al. 2017). AdG-I, portanto, engloba um maior contingente de variantes histológicas que podem refletir perfis mutacionais distintos. Além disso, é possível, pelo menos em parte, que as diferenças nos perfis

mutacionais possam refletir uma eventual heterogeneidade celular em diferentes regiões do tumor.

Identificamos em nossa coorte dois padrões distintos de mutações entre os AdG-SI. Os AdG-SI tipo difuso de Lauren tiveram uma média de mutações menor que os AdG-SI não-difusos (4 x 15;  $p=0,14$ ) e teve entre os genes mais mutados *CDH1* e *ARHGAP20*, genes associados ao subtipo difuso de Lauren (CHO et al. 2017; KAKIUCHI et al. 2014). Já os AdG-SI não-difusos apresentaram alta FM em *TP53* (44%).

Segundo a classificação da OMS, o componente em anel de sinete deve conter estar presente em mais de 50% da área tumoral para o tumor ser classificado como carcinoma com células em anel de sinete (BOSMAN et al. 2010). Assim como no caso dos AdG-T, a identificação de dois grupos com perfis moleculares distintos entre os AdG-SI pode relacionar-se à heterogeneidade tumoral. Em análises retrospectivas, a disponibilidade de lâminas e blocos pode ser limitada e não mais representar o tumor por inteiro. É possível que estes tumores classificados como tipo intestinal de Lauren sejam mistos, contendo componentes tanto difuso como intestinal. Planejamos rever novamente os laudos anátomo-patológicos para melhor compreensão deste achado.

Entre os AdG-D e os AdG-I, observamos perfis moleculares bastante distintos. Os AdG-D apresentaram menor média de mutações por amostra (9 x 5;  $p<0,0001$ ) e menor relação NS/S (2,8 x 4,56;  $p=0,005$ ). Esse padrão na nossa coorte reproduz o observado no TCGA, com média de mutações por amostra maior nos AdG-I ( $n=188$ ) do que nos 63 AdG-D (131 x 214;  $p=0,0003$ ). A relação NS/S no TCGA também foi menor nos AdG-D (2,48 x 2,67;  $p=0,0002$ ). Os dados também corroboram outra descrição na literatura que reportou menor número de INDELS e SNVs nos AdG-D (WANG et al. 2014).

Observamos um grupo de 8 genes preferencialmente mutados nos AdG-I: *TP53* ( $p<0,001$ ; FDR=0,037), *LARPB4* ( $p<0,01$ ; FDR=0,4), *ACVR2A* ( $p<0,01$ ; FDR=0,43), *FAT4* ( $p<0,01$ ; FDR=0,43), *RPL22* ( $p<0,05$ ; FDR=0,46), *PKHD1* ( $p<0,05$ ; FDR=0,48), *GLI3* ( $p<0,05$ ; FDR=0,52) e *RNF43* ( $p<0,05$ ;

FDR=0,52) (Figura 24). Com exceção de *TP53*, todos esses genes também estiveram preferencialmente mutados entre os casos com CMT-A. De fato, a maioria dos casos com CMT-A eram AdG-I (8/12; 66,6%).

A comparação direta dos AdG-D com os AdG-I revelou perfis mutacionais distintos. Por exemplo, a FM de *TP53* foi muito maior nos AdG-I (50% X 12%;  $p < 0,0001$ ; FDR < 0,01). Essa discrepância também foi observada na coorte do TCGA, com FM de *TP53* 24% nos AdG-D e 38% nos AdG-I.

WANG et al. (2014) relataram que os AdG-D apresentaram elevado nível de metilação em ilhas de CpG e que metilação em CpG associou-se inversamente com mutações em *TP53*.

#### 5.2.4 Carga mutacional dos tumores

Doze tumores (10,7%) foram classificados como CMT-A ( $\geq 19$  variantes), 42 (37,7%) como CMT-I ( $>4$  e  $<19$  variantes) e 56 (50%) como CMT-B ( $\leq 4$  variantes).

No TCGA, os casos com tumores hipermutados (MSI) foram diagnosticados em idade mais avançada (mediana 72 anos;  $p < 0,001$ ). Na nossa casuística, os casos com CMT-A também apresentaram idade mais avançada ao diagnóstico (mediana 69,5 em contraste a 65 anos e 58 anos para CMT-I e CMT-B, respectivamente;  $p = 0,005$ ). No TCGA, não foram observadas diferenças na carga mutacional entre pacientes ocidentais e orientais. (THE CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK 2014). Na nossa coorte, também não observamos diferenças na distribuição da carga mutacional dos tumores de acordo com a ancestralidade genômica.

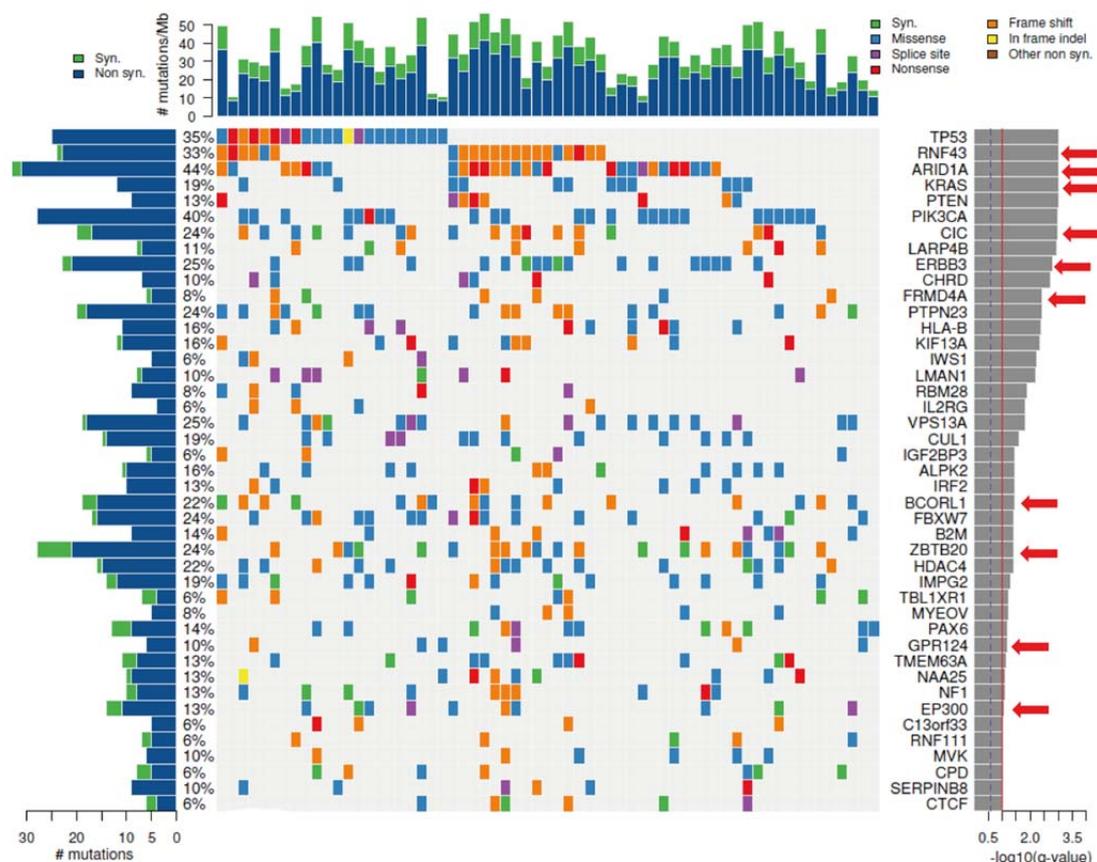
O *Asian Cancer Research Group* (ACRG) reportou entre os casos com MSI uma predominância de tumores do antro (75%) e de AdG-I (60%) (CRISTESCU et al. 2015). Os casos com CMT-A na nossa coorte tinham padrão semelhante, com 8 dos 12 tumores (66,7%) localizados no antro e tendo padrão intestinal de Lauren. Uma limitação do nosso estudo foi ainda não termos conseguido realizar a análise de instabilidade de microssatélites, mas é razoável supor que os 12 casos com CMT-A terão MSI.

Os 26 genes preferencialmente mutados (FDR<0,05) nos tumores CMT-A foram *RPL22*, *ACVR2A*, *TGFBR2*, *RNF43*, *LARP4B*, *KMT2C*, *BCORL1*, *MACF1*, *CTCF*, *ZBTB20*, *MSH6*, *ARID1A*, *CIC*, *FRMD4A*, *GPR124*, *PKHD1*, *EP300*, *FAT4*, *SPTA1*, *ERBB3*, *BCOR*, *KRAS*, *CMYA5*, *GLI3*, *ERBB2* e *RIMS2* (Figura 27).

Uma questão não esclarecida é se alguns desses genes poderiam ser determinantes de um padrão hipermutado nos tumores. Naturalmente, genes envolvidos no reparo do DNA como *MSH6* são fortes candidatos participação no desencadeamento dos processos que levam ao estado hipermutado dos tumores. A lista pode ser estendida para os genes *RPL22*, *ACVR2A*, *LARP4B*, *CTCF*, *SPTA1* e *KRAS*, enriquecidos nos casos com CMT-A e que não apresentaram variantes NS em nenhum dos 58 casos com CMT-B. No entanto, por se tratar de um painel com número restrito de genes, é possível que todos esses candidatos sejam resultado e não causa por trás dos processos que levam a CMT-A. E dentre os casos com WES havia apenas 2 com CMT-A, número insuficiente para gerar conclusões a esse respeito.

Da lista de genes enriquecidos nos tumores com CMT-A, *ARID1A*, *BCORL1*, *CIC*, *CTCF*, *EP300*, *ERBB3*, *FRMD4A*, *GPR124*, *KRAS*, *LARP4B*, *RNF43*, *ZBTB20* também estão enriquecidos entre os tumores hipermutados na coorte do TCGA (Figura 36). Essa coincidência, aliada ao fato de que vários desses genes foram descritos em outras análises moleculares de AdG, reforça a possibilidade de que tais genes não estejam mutados aleatoriamente, mas que de alguma maneira tenham relação com os processos que levam a CMT-A (CHEN et al. 2015; WANG et al. 2011, 2014).

No TCGA, os autores não reportaram diferenças de sobrevida entre os grupos MSI (enriquecido com os casos hipermutados), EBV+, GS, CIN. No entanto, não foi reportada análise específica sobre o efeito prognóstico dos tumores com carga mutacional alta (THE CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK 2014).



**Figura 36** – Genes com maior frequência mutacional nos casos hipermutados do TCGA.

Setas indicam os genes que também se mostraram preferencialmente mutados nos casos com CMT-A na nossa coorte. CMT-A: carga mutacional dos tumores alta ( $\geq 19$  mutações/tumor). Fonte: adaptado de THE CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK (2014).

A CMT é um fator preditor de sobrevida em pacientes com câncer avançado tratados com inibidores de checkpoints imunológicos (ICI; anti-PD1, anti-PD-L1, anti-CTLA4). Uma análise recente de 1662 pacientes com 10 tipos de câncer (126 deles com tumores esôfago-gástricos), todos previamente tratados com ICI isolado ou em combinação, demonstrou que os casos com CMT alta apresentaram maior SG. Os tumores foram testados com um amplo painel de captura incluindo algumas centenas de genes (MSI-IMPAKT) e os 20% com maior número de mutações NS em cada grupo de tumores foram definidos como tendo CMT alta (SAMSTEIN et al. 2019).

O impacto prognóstico da CMT no AdG tem sido pouco explorado na literatura. CHO et al. (2019) analisaram 330 AdG em pacientes coreanos

com um painel de 381 genes. Os autores definiram o *cutoff* de 10,5 mutações por Mb e identificaram 37 casos (11%) com CMT-A. A média de mutações por tumor no grupo com CMT-A foi 43 e no grupo com CMT-B foi 16. O grupo com CMT-A, em sua maioria, também tinha MSI e era do tipo intestinal de Lauren. Além disso, os autores reportaram prognóstico favorável associado a CMT-A, um efeito inverso ao observado em nossa coorte. No entanto, a publicação não menciona se a sobrevida foi ajustada para fatores confundidores como o estadiamento, o que seria importante devido à maior concentração de CMT-A em estádios iniciais. Os autores propõem a hipótese de que um maior número de variantes geraria mais neoantígenos que ativariam uma resposta imune celular antitumoral, justificando assim o melhor prognóstico dos pacientes.

Diferenças na definição de *cutoff* e a exclusão de outliers extremos no TCGA (THE CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK 2014) podem dificultar a comparação dos resultados discrepantes quanto ao impacto prognóstico da CMT. No nosso estudo, o *cutoff* entre CMT-B e CMT-I foi a mediana de mutações por amostra (4), o que na prática acabou incorporando pacientes com número de mutações por amostra baixo (ex.: 5, 6 ou 7 mutações por amostra) no grupo com CMT-I.

Quando analisamos a CMT em três níveis não observamos diferenças de SG estatisticamente significativas entre os grupos.

Em resumo, a CMT correlacionou-se com algumas características clínicas como tipo intestinal de Lauren, idade dos pacientes e localização do tumor, de maneira semelhante ao descrito na literatura. No geral, comparando os 3 níveis de CMT, não identificamos impacto prognóstico relacionado à CMT.

### **5.3 ANCESTRALIDADE**

A incidência de AdG é consideravelmente maior na Ásia do que nos países ocidentais. Mais da metade dos casos de AdG diagnosticados a cada ano vem do Leste da Ásia (56%, sendo 41% apenas da China e 11% do

Japão). Contudo, as estatísticas de sobrevida em 5 anos denotam taxas muito maiores no Japão (40 a 60%) do que nos EUA e na Europa (15 a 20%). As possíveis causas relacionadas à pior sobrevida de pacientes com AdG no mundo ocidental podem estar relacionadas a diversas causas como diagnóstico mais tardio (53% de estádios iniciais no Japão x 27% nos EUA), biologia tumoral (mais tumores de cárdia nos países ocidentais em comparação a predominância de tumores distais na Ásia) e tipo de tratamento (cirurgias radicais com linfadenectomias ampliadas são rotineiras na Ásia e tem padrão menos homogêneo no ocidente) (KIM et al. 2010; OHTSU et al. 2006).

Os resultados de alguns estudos randomizados que recrutaram pacientes com AdG tanto na Ásia quanto em países ocidentais permitem analisar se, em uma situação controlada para múltiplas características clínicas e recebendo o mesmo tratamento, a sobrevida de pacientes asiáticos e ocidentais seria equivalente. Em alguns desses estudos publicados nos últimos anos (OHTSU et al. 2011; WILKE et al. 2014), observamos melhor desempenho de pacientes asiáticos em relação aos ocidentais mesmo no braço controle (tratamento padrão), sugerindo que a disparidade de sobrevida esteja mais relacionada à biologia tumoral ou ao *background* genético dos indivíduos do que ao tratamento implementado.

Um exemplo é o estudo RAINBOW (WILKE et al. 2014), que recrutou pacientes com diagnóstico de AdG metastático, com progressão de doença após uma linha de tratamento. Indivíduos de 27 países foram randomizados para tratamento de segunda linha com paclitaxel + placebo (controle) ou paclitaxel + ramucirumabe (braço teste). Em comparação aos ocidentais, os pacientes japoneses apresentaram algumas características clínicas associadas a melhor prognóstico, como maior percentual de ECOG 0 e menor número de sítios de metástases. Quanto ao tratamento recebido na 1ª linha, 100% dos japoneses receberam esquemas de quimioterapia menos agressivos com 2 drogas, enquanto mais de 1/3 dos ocidentais recebeu esquemas mais agressivos contendo 3 drogas na primeira linha. Mesmo recebendo tratamento de 1ª linha mais agressivo, os pacientes ocidentais

apresentaram menor proporção de respostas duradouras (>6 meses) do que os japoneses. Quanto aos desfechos no próprio estudo, tanto no braço controle quanto no braço teste os japoneses superaram o desempenho dos ocidentais em taxa de resposta, sobrevida global e sobrevida livre de progressão. A sobrevida global mediana no braço controle foi 11,5 meses entre japoneses e 5,9 meses entre ocidentais, disparidade também observada no braço teste (11,4 meses x 8,6 meses, respectivamente) (DAVIDSON e CHAU 2016).

Outra evidência contrária à tese de que as diferenças de sobrevida entre asiáticos e ocidentais deve-se a diferenças no tratamento instituído veio de um estudo realizado com dados do registro de câncer do condado de Los Angeles, na Califórnia (EUA). Analisando dados de 13.084 pacientes com AdG tratados em Los Angeles entre 1988 e 2006, os autores demonstraram que a mediana de sobrevida global foi estatisticamente superior ( $p < 0,001$ ) nos pacientes asiáticos em comparação aos brancos (8,4 meses), hispânicos (8,7 meses) e negros (7,9 meses). Essa diferença também favorável aos asiáticos no subgrupo de pacientes operados com intenção curativa (32,7 meses x 18,8 meses x 19,9 meses x 18,9 meses, respectivamente;  $p < 0,001$ ). Como todos os pacientes foram tratados nos EUA, não é possível atribuir a disparidade de sobrevida ao tratamento cirúrgico mais agressivo realizado nos países asiáticos.

A população brasileira é descrita como miscigenada a partir da mistura de povos indígenas, negros, europeus, asiáticos, dentre outros. Contudo, é muito difícil definir a etnia/raça de brasileiros em questionários de pesquisa. No Censo Demográfico brasileiro de 2010, a população brasileira se autodeclarou assim: 47,7% brancos, 43,1% pardos, 7,6% negros, 1,1% amarelos e 0,4% indígenas (<https://biblioteca.ibge.gov.br>).

Pelos motivos acima dispostos, decidimos caracterizar a ancestralidade genômica predominante dos indivíduos da coorte a partir do DNA tumoral. Buscamos investigar uma possível relação entre ancestralidade e características clínicas da doença, perfil molecular dos tumores e/ou sobrevida dos pacientes.

Observamos uma predominância de ancestralidade europeia na coorte estudada (62/112; 55,4%), em consonância com o previamente descrito na população brasileira (PENA et al. 2011; SALOUM DE NEVES MANTA et al. 2013). A segunda ancestralidade mais comum foi a asiática (31/112; 27,7%), talvez refletindo um viés oriundo da localização do A.C. Camargo Cancer Center na região da cidade de São Paulo com alta concentração de orientais, e a menos representativa foi a africana (10/112; 8,9%). Nove casos (8%) não apresentaram predominância de ancestralidade e foram denominados, para fins de distinção dos demais grupos, miscigenados.

Os MIA utilizados neste estudo permitem inferir nove origens biogeográficas: Mediterrâneo, Norte da Europa, Nordeste Asiático, Nativo Americano, Oceania, Sul da África, Sudeste Asiático, Sudoeste Asiático, África Subsaariana. Nossa opção por agregá-las em apenas 3 grupos (Europa, Ásia e África) visou facilitar as análises estatísticas considerando o número limitado de casos da coorte (112 tumores).

Em nossa coorte, os tumores apresentaram em média 406 MIA. Essa é uma força da nossa análise. Para exemplificação, PENA et al. (2011) e SALOUM DE NEVES MANTA et al. (2013) analisaram a ancestralidade da população brasileira com painéis de menos de 50 MIA.

Não observamos diferenças relevantes entre os grupos ancestrais na maioria das características clínicas analisadas (idade, localização, histologia e estadiamento). Houve diferença estatisticamente significativa na proporção de gênero ( $p=0,04$ ), principalmente porque todos os nove casos miscigenados foram do sexo masculino. Além disso, observamos uma possível diferença entre os grupos ancestrais quanto à positividade para EBV ( $p=0,056$ ). Dois dos 5 casos EBV positivos na coorte (40%) foram identificados com origem biogeográfica africana.

Alguns estudos avaliaram a correlação entre EBV e etnia, mas nenhum deles avaliou a correlação de EBV com a ancestralidade genômica dos pacientes. AdG associado a EBV tem sido descrito como mais prevalente nas Américas do que na Ásia (ALARCÓN et al. 2017). (VO et al.

2002) VO ET AL. descreveram 10 casos de AdG EBV positivo em 107 pacientes nos EUA (9,3%), com 8 deles sendo em pacientes hispânicos (8/10; 80%) e apenas 2 (2/10; 20%) em brancos não hispânicos. No Brasil, KORİYAMA et al. (2001) analisaram 300 casos de AdG, sendo 149 em brasileiros de origem japonesa e 151 em brasileiros sem origem japonesa. Entre os brasileiros de origem japonesa, eles descreveram a presença de EBV em 7 tumores (4,7%). Entre os brasileiros não japoneses, eles encontraram EBV positivo em 10,3% dos caucasianos (13/126) e em 16% dos negros (4/25).

EBV é endêmico em regiões da África e tumores a ele relacionados têm alta incidência no continente africano (carcinoma de nasofaringe, linfoma de Burkitt). Contudo, praticamente não há estudos avaliando a incidência de AdG associado a EBV em países africanos. Um estudo tunisiano descreveu 4 AdG EBV positivos em 96 casos testados (4,1%) (TRIMECHE et al. 2009) (PMID: 19491698). Outro estudo mais recente em pacientes do Sudão encontrou 11 casos positivos para EBV em 50 AdG analisados (22%) (OMER et al. 2016).

Nossos dados, portanto, corroboram com a descrição prévia de KORİYAMA et al. (2001) de maior prevalência de EBV positivo em AdG entre negros no Brasil. Contudo, devido ao reduzido número de pacientes com ancestralidade africana em nossa coorte (10 casos), esse dado é gerador de hipótese e será melhor avaliado em estudos futuros.

Nós investigamos se a AP seria um fator independente capaz de influenciar no prognóstico de pacientes com AdG. Nessa coorte, não observamos diferenças relevantes na SG dos dois grupos mais representados, AP europeia (n=62; SG 86 meses; IC95% 75-110) e AP asiática (n=31; SG 83 meses; IC95% 51-NA). Contudo, apesar do número de pacientes reduzido com AP africana (n=10), a SG nesse grupo foi bem mais baixa (67 meses; IC95% 22-NA). No modelo de regressão de Cox ajustado com entrada forçada da variável estágio clínico, a ancestralidade africana mostrou-se associada à SG de maneira independente (HR 2,76; IC95% 1,11-6,86; p=0,028). O pequeno grupo altamente miscigenado

apresentou a menor SG entre todos (38 meses; IC95% 31-NA), mas apesar disso a diferença não foi estatisticamente significativa.

Quando analisamos a SLD, observamos uma mediana maior no grupo com AP asiática (82 meses; IC95% 44-106) em relação à mediana no grupo com AP europeia (68 meses; IC95% 38-86), sem significância estatística. De maneira semelhante ao observado para SG, a AP africana mostrou-se um fator associado à SLD de maneira independente no modelo de regressão de Cox ajustado para estágio clínico (HR 2,53; IC95% 1,02-6,28;  $p=0,044$ ).

Portanto, em nossa coorte, não observamos melhores desfechos de sobrevida nos casos com AP asiática como descrito na literatura, mas observamos um prognóstico desfavorável nos casos com AP africana. Esse achado é fruto de uma análise exploratória com número limitado de casos e necessita validação em outra coorte com um número maior de casos, preferencialmente ajustando também para fatores sócio-econômicos.

Quanto ao perfil mutacional, não observamos diferenças estatisticamente significativas na média de mutações por tumor ou na relação NS/S entre os grupos ancestrais. Contudo, chama atenção a relação NS/S elevada no grupo com AP africana (5,5).

Nosso principal achado relacionado a particularidades no perfil mutacional entre os grupos ancestrais foi o enriquecimento de mutações em *BRCA2* e *IMPG2* nos casos com AP asiática. Esse foi o único grupo de toda a coorte em que esses genes figuraram entre os 10 mais mutados. Como mencionado previamente, a FM de *BRCA2* no subgrupo com AP asiática em comparação às demais ancestralidades foi 29% x 9% ( $p=0,009$ ; FDR=1).

A FM de *IMPG2* foi 4,5% (5/112), todos eles com AP asiática. No COSMIC, a FM é 3,8% (33/860) e no TCGA é 3,3% (14/427).

*IMPG2* (*Homo sapiens interphotoreceptor matrix proteoglycan 2*) é um proteoglicano cujas funções conhecidas estão relacionadas à maturação manutenção de receptores fotossensíveis do olho. Até este momento, não há descrição na literatura sobre a função de *IMPG2* no AdG.

Quando analisamos os 52 casos com predominância de MIAs superior a 75% para uma mesma ancestralidade, observamos mais algumas diferenças no perfil molecular relacionado aos grupos ancestrais. Os genes *ARID1A* ( $p=0,01$ ; FDR 0,95), *TGFBR2* ( $p=0,03$ ; FDR=0,95) e *ACVR2A* ( $p=0,04$ ; FDR 0,95) mostraram-se mais mutados entre os casos com AP europeia. O gene *FRMD4* esteve mais mutado nos casos com AP africana ( $p=0,04$ ; FDR=0,95) e o gene *GPR124* esteve preferencialmente mutado entre os indivíduos com AP asiática ( $p=0,046$ ; FDR 0,95).

O número de casos nesta coorte limita avaliação do impacto prognóstico de mutações ou grupos de genes com mutações nos subgrupos com menos de uma dezena de casos. Em nossos próximos passos, pretendemos avaliar o impacto prognóstico da AP dos pacientes com AdG em uma coorte com maior número de casos. No momento, há uma coorte prospectiva com cerca de 200 casos recrutados. Além disso, pretendemos também aplicar a metodologia utilizada neste estudo para reclassificar a coorte do TCGA de acordo com a AP dos casos.

## 6 CONCLUSÃO

Este estudo realizou uma análise descritiva e exploratória do perfil mutacional tumoral em uma coorte composta por 112 casos de AdG. Utilizamos um painel de captura com 99 genes previamente descritos no AdG e realizamos o sequenciamento completo do exoma de 24 casos. Além disso, avaliamos o impacto prognóstico da ancestralidade genômica de pacientes com AdG, algo inédito na literatura.

Uma das forças da nossa análise é o conjunto de dados clínicos disponíveis que nos permitiu identificar perfis mutacionais distintos em subgrupos de interesse clínico como sexo, idade, histologia (classificações de Lauren e da OMS) e topografia dos tumores (proximais x distais).

A literatura sobre AdG tem enriquecido com a publicação de amplas análises moleculares nos últimos anos, mas boa parte delas carece de dados de sobrevida e do impacto prognóstico das alterações descritas (CHEN et al. 2015; THE CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK 2014; WANG et al. 2014; ZANG et al. 2012). Um dos pontos fortes do nosso trabalho é o longo tempo de seguimento da coorte (mediana de 95 meses), que nos permitiu avaliar o impacto prognóstico de alterações clínicas e moleculares observadas e o impacto prognóstico da ancestralidade genômica dos pacientes.

Contudo, o número relativamente pequeno de pacientes estudados (n=112) limitou a avaliação do impacto prognóstico de variáveis com múltiplos graus de liberdade e o impacto prognóstico de genes com baixa frequência mutacional.

A despeito disso, conseguimos traçar o perfil molecular de câncer gástrico em um grupo de pacientes brasileiros e conseguimos contribuir para o debate sobre o prognóstico de pacientes asiáticos e ocidentais com AdG. Pela primeira vez, demonstramos que em uma população etnicamente miscigenada como a brasileira, a ancestralidade genômica asiática *per se* não representa um fator prognóstico independente. E levantamos a hipótese

de que em nossa população, talvez a ancestralidade predominante africana esteja associada a um prognóstico adverso, achado que necessitará de investigação posterior para confirmação.

Conseguimos também contribuir para o debate sobre o impacto prognóstico dos genes mutados em AdG. Identificamos *RHOA* como um possível fator associado a prognóstico favorável, dado que também deverá ser validado em análise posterior. Demonstramos que *FAT4* e *ARID1A* são genes com alta FM em nossa coorte e não estão associados a prognóstico desfavorável, ao contrário de relatos prévios (JIANG et al. 2018; YANG et al. 2016). O efeito prognóstico adverso de *ARID1A* foi descrito em pacientes asiáticos (YANG et al. 2016). Em nosso estudo, conseguimos inclusive avaliar o impacto prognóstico desse gene na população com AP asiática (sem impacto prognóstico).

CHEN et al. (2015) descreveram o efeito prognóstico favorável de *BRCA2* mutado em uma coorte de pacientes chineses prognóstico (HR= 0,37; IC95% 0,13-0,96; p=0,05). Demonstramos na nossa casuística uma maior FM de *BRCA2* nos casos com AP asiática (29% x 9%; p=0,009; FDR=1), mas não observamos o mesmo efeito sobre o prognóstico. Na verdade, em nossa coorte os casos com *BRCA2* mutado apresentaram SG e SLD numericamente menor, mas sem significância estatística em relação aos casos sem mutação.

Ainda sobre a ancestralidade genômica, do nosso conhecimento, a análise da AP dos indivíduos a partir de leituras *off-target* de um painel de captura não foi utilizado previamente, pelo menos no contexto oncológico. Essa é outra contribuição inédita deste estudo.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alarcón A, Figueroa U, Espinoza B, et al. Epstein-Barr Virus-Associated Gastric Carcinoma: The Americas' Perspective. In: Mozsik G, Karádi O, editors. **Gastric Cancer**. London: InTech, 2017.

Alexander DH, Novembre J, Lange K. Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals. **Genome Res** 2009; 19:1655-64.

Bang Y-J, Van Cutsem E, Feyereislova A, et al. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. **Lancet** 2010; 376:687-97.

Begnami MD, Fukuda E, Fregnani JHTG, et al. Prognostic implications of altered human epidermal growth factor receptors (HERs) in gastric carcinomas: HER2 and HER3 are predictors of poor outcome. **J Clin Oncol** 2011; 29:3030-6.

Bosman F, Carneiro F, Hruban R, Theise N. **WHO classification of tumours of the digestive system, fourth edition**. 4<sup>th</sup> ed. France: IARC; 2010.

Bray F, Jemal A, Grey N, Ferlay J, Forman D. Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008-2030): A population-based study. **Lancet Oncol** 2012; 13:790-801.

Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA Cancer J Clin** 2018; 68:394-424.

Cancer Research UK. **Stomach cancer survival statistics**. Disponível em: <<https://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/statistics-by-cancer-type/stomach-cancer/survival#heading-Zero>>.

Acesso em: 4 mar. 2018.

Chang KK, Cho S-J, Yoon C, Lee JH, Park DJ, Yoon SS. Increased RhoA Activity Predicts Worse Overall Survival in Patients Undergoing Surgical Resection for Lauren Diffuse-Type Gastric Adenocarcinoma. **Ann Surg Oncol** 2016; 23:4238-4246.

Chen K, Yang D, Li X, et al. Mutational landscape of gastric adenocarcinoma in Chinese: Implications for prognosis and therapy. **Proc Natl. Acad Sci** 2015; 112:1107-1112.

Cho J, Ahn S, Son D-S, et al. Bridging genomics and phenomics of gastric carcinoma. **Int. J Cancer** 2019; 00:1-11.

Cho S-J, Yoon C, Lee JH, et al. KMT2C Mutations in Diffuse-Type Gastric Adenocarcinoma Promote Epithelial-to-Mesenchymal Transition. **Clin Cancer Res** 2018; 24:6556-6569.

Cho SY, Park JW, Liu Y, et al. Sporadic Early-Onset Diffuse Gastric Cancers Have High Frequency of Somatic CDH1 Alterations, but Low Frequency of Somatic RHOA Mutations Compared With Late-Onset Cancers. **Gastroenterology** 2017; 153:536-549.e26.

Chon HJ, Hyung WJ, Kim C, et al. Differential Prognostic Implications of Gastric Signet Ring Cell Carcinoma: Stage Adjusted Analysis From a Single High-volume Center in Asia. **Ann Surg** 2017; 265:946-953.

Correa P, Houghton JM. Carcinogenesis of Helicobacter pylori. **Gastroenterology** 2007; 133:659-672.

Coupland VH, Allum W, Blazeby JM, et al. Incidence and survival of oesophageal and gastric cancer in England between 1998 and 2007, a population-based study. **BMC Cancer** 2012; 12:11.

Crew KD, Neugut AI. Epidemiology of gastric cancer. **World J. Gastroenterol.** 2006; 12:354-62.

Cristescu R, Lee J, Nebozhyn M, et al. Molecular analysis of gastric cancer identifies subtypes associated with distinct clinical outcomes. **Nat Med** 2015; 21:449-56.

Cunningham D, Starling N, Rao S, et al. Capecitabine and oxaliplatin for advanced esophagogastric cancer. **N Engl J Med** 2008; 358:36-46.

Da Costa WL, Coimbra FJF, Ribeiro HSC, et al. Total gastrectomy for gastric cancer: an analysis of postoperative and long-term outcomes through time: results of 413 consecutive cases in a single cancer center. **Ann Surg Oncol** 2015; 22:750-7.

Davidson M, Chau I. Variations in outcome for advanced gastric cancer between Japanese and Western patients: A subgroup analysis of the RAINBOW trial. **Transl Gastroenterol Hepatol** 2016; 2016:

De Souza Giusti ACB, De Oliveira Salvador PTC, Dos Santos J, et al. Trends and predictions for gastric cancer mortality in Brazil. **World J Gastroenterol** 2016; 22:6527-38.

Dupont JB, Lee JR, Burton GR, Cohn I. Adenocarcinoma of the stomach: Review of 1,497 cases. **Cancer** 1978; 41:941-947.

Elhaik E, Tatarinova T, Chebotarev D, et al. Geographic population structure analysis of worldwide human populations infers their biogeographical origins. **Nat Commun** 2014; 5:3513.

Giryes A, Oweira H, Mannhart M, Decker M, Abdel-Rahman O. Exploring the differences between early-onset gastric cancer and traditional-onset gastric cancer. **J Gastrointest Oncol** 2018; 9:1157-1163.

GLOBOCAN. **Estimated number of cases stomach, both sexes, all ages - WORLDWIDE**. Available from: <URL:<https://bit.ly/2OAtXWf>>. [2019a fev 10].

GLOBOCAN. **Estimated number of cases stomach, both sexes, all ages - Latin America and the Caribbean**. Available from: <URL:<https://bit.ly/2FAMpu0>>. [2019a fev 10].

Guimarães RM, Muzi CD. Trend of mortality rates for gastric cancer in Brazil and regions in the period of 30 years (1980-2009). **Arq Gastroenterol** 2012; 49:184-8.

Hechtman JF, Polydorides AD. HER2/neu gene amplification and protein overexpression in gastric and gastroesophageal junction adenocarcinoma: a review of histopathology, diagnostic testing, and clinical implications. **Arch Pathol Lab Med** 2012; 136:691-7.

Henson DE, Dittus C, Younes M, Nguyen H, Albores-Saavedra J. Differential trends in the intestinal and diffuse types of gastric carcinoma in the United States, 1973-2000: increase in the signet ring cell type. **Arch Pathol Lab Med** 2004; 128:765-70.

Hurst LD. The Ka/Ks ratio: diagnosing the form of sequence evolution. **Trends Genet** 2002; 18:486.

Ikeda Y, Mori M, Kamakura T, Haraguchi Y, Saku M, Sugimachi K. Improvements in diagnosis have changed the incidence of histological types in advanced gastric cancer. **Br J Cancer** 1995; 72:424-6.

Jakubowska A, Scott R, Menkiszak J, et al. A high frequency of BRCA2 gene mutations in Polish families with ovarian and stomach cancer. **Eur J Hum Genet** 2003; 11:955-8.

Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. **CA Cancer J Clin** 2011; 61:69-90.

Jeong O, Park Y-K. Clinicopathological features and surgical treatment of gastric cancer in South Korea: the results of 2009 nationwide survey on surgically treated gastric cancer patients. **J Gastric Cancer** 2011; 11:69-77.

Jiang X, Liu Z, Xia Y, et al. Low FAT4 expression is associated with a poor prognosis in gastric cancer patients. **Oncotarget** 2018; 9:5137-54.

Jiménez Fonseca P, Carmona-Bayonas A, Hernández R, et al. Lauren subtypes of advanced gastric cancer influence survival and response to chemotherapy: real-world data from the AGAMENON National Cancer Registry. **Br J Cancer** 2017; 117:775-82.

Kakiuchi M, Nishizawa T, Ueda H, et al. Recurrent gain-of-function mutations of RHOA in diffuse-type gastric carcinoma. **Nat Genet** 2014; 46:583-7.

Katai H, Ishikawa T, Akazawa K, et al. Five-year survival analysis of surgically resected gastric cancer cases in Japan: a retrospective analysis of more than 100,000 patients from the nationwide registry of the Japanese Gastric Cancer Association (2001-2007). **Gastric Cancer** 2018; 21:144-54.

Kim J, Sun C-L, Mailey B, et al. Race and ethnicity correlate with survival in patients with gastric adenocarcinoma. **Ann Oncol** 2010; 21:152-60.

Kong X, Wang J-L, Chen H-M, Fang J-Y. Comparison of the clinicopathological characteristics of young and elderly patients with gastric carcinoma: a meta analysis. **J Surg Oncol** 2012; 106:346-52.

Koriyama C, Akiba S, Iriya K, et al. Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma in Japanese Brazilians and non-Japanese Brazilians in São Paulo. **Japanese J Cancer Res** 2001; 92:911-917.

Lauren P. The Two Histological Main Types of Gastric Carcinoma: Diffuse and So-Called Intestinal-Type Carcinoma. An Attempt at a Histo-Clinical Classification. **Acta Pathol Microbiol Scand** 1965; 64:31-49.

Lu M, Yang Z, Feng Q, et al. The characteristics and prognostic value of signet ring cell histology in gastric cancer: A retrospective cohort study of 2199 consecutive patients. **Medicine (Baltimore)** 2016; 95:e4052.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2018.

Nakayama I, Chin K, Takahari D, et al. Treatment features of systemic chemotherapy in young adults with unresectable advanced or recurrent gastric cancer. **Cancer Manag Res** 2018; 10:5283-90.

Ohtsu A, Shah MA, Van Cutsem E, et al. Bevacizumab in combination with chemotherapy as first-line therapy in advanced gastric cancer: A randomized, double-blind, placebo-controlled phase III study. **J Clin Oncol** 2011; 29:3968-76.

Ohtsu A, Yoshida S, Saijo N. Disparities in gastric cancer chemotherapy between the east and west. **J Clin. Oncol** 2006; 24:2188-96.

Omer I, Salahddin D, Musa HH, Ahmed M, Abdalrahman H. Association Of Epstein-Barr Virus With Gastric Carcinoma Among Sudanese Patients. **J. Cancer Genet Biomarkers** 2016; 1:46-53.

Pena SDJ, Di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, et al. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. **PLoS One** 2011; 6:e17063.

Petrelli F, Berenato R, Turati L, et al. Prognostic value of diffuse versus intestinal histotype in patients with gastric cancer: a systematic review and meta-analysis. **J Gastrointest Oncol** 2017; 8:148-63.

Piso P, Werner U, Lang H, Mirena P, Klempnauer J. Proximal versus distal gastric carcinoma--what are the differences? **Ann Surg Oncol** 2000; 7:520-5.

Pizzi MP, Bartelli TF, Pelosof AG, et al. Identification of DNA mutations in gastric washes from gastric adenocarcinoma patients: possible implications for liquid biopsies and patient follow-up. **Int J Cancer** 2019; Feb 18. [Epub ahead of print]

Postlewait LM, Squires MH, Kooby DA, et al. The Prognostic Value of Signet-Ring Cell Histology in Resected Gastric Adenocarcinoma. **Ann Surg Oncol** 2015; 22 Suppl 3:S832-9.

Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, et al. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. **Am J Hum Genet** 2007; 81:559-75.

Rocken C, Behrens HM, Boger C, Krüger S. Clinicopathological characteristics of RHOA mutations in a Central European gastric cancer cohort. **J Clin Pathol** 2016; 69:70-5.

RStudio Team. **RStudio: Integrated Development for R.** Boston, MARStudio, Inc.; 2015. Available from: <URL:<http://www.rstudio.com/>>

Sakamoto H, Yoshimura K, Saeki N, et al. Genetic variation in PSCA is associated with susceptibility to diffuse-type gastric cancer. **Nat Genet** 2008; 40:730-40.

Saloum de Neves Manta F, Pereira R, Vianna R, et al. Revisiting the genetic ancestry of Brazilians using autosomal AIM-Indels. **PLoS One** 2013; 8:e75145.

Samstein RM, Lee C-H, Shoushtari AN, et al. Tumor mutational load predicts survival after immunotherapy across multiple cancer types. **Nat Genet** 2019; 51:202-206.

Shi Y, Hu Z, Wu C, et al. A genome-wide association study identifies new susceptibility loci for non-cardia gastric cancer at 3q13.31 and 5p13.1. **Nat Genet** 2011; 43:1215-8.

Silva EM DA, Fregnani JHTG, Martel G, et al. Molecular Analyses of Early-Onset Gastric Cancer in Brazilian Patients: TP53 Mutations, Cadherin-Catenin and Mucins Proteins Expression. **J Cancer Ther** 2013; 4:33-42.

Taghavi S, Jayarajan SN, Davey A, Willis AI. Prognostic significance of signet ring gastric cancer. **J Clin Oncol** 2012; 30:3493-8.

Tajima Y, Yamazaki K, Makino R, et al. Differences in the histological findings, phenotypic marker expressions and genetic alterations between adenocarcinoma of the gastric cardia and distal stomach. **Br J Cancer** 2007; 96:631-638.

The Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. **Nature** 2014; 513:202-9.

Trimeche M, Ksiâa F, Ziadi S, et al. Prevalence and characteristics of Epstein-Barr virus-associated gastric carcinomas in Tunisia. **Eur J Gastroenterol Hepatol** 2009; 21:1001-7.

Van der Auwera GA, Carneiro MO, Hartl C, et al. From FastQ data to high confidence variant calls: the Genome Analysis Toolkit best practices pipeline. **Curr Protoc Bioinforma** 2013; 43:11.10.1-33.

Vo QN, Geradts J, Gulley ML, Boudreau DA, Bravo JC, Schneider BG. Epstein-Barr virus in gastric adenocarcinomas: Association with ethnicity and CDKN2A promoter methylation. **J Clin Pathol** 2002; 55:669-75.

Wang K, Kan J, Yuen ST, et al. Exome sequencing identifies frequent mutation of ARID1A in molecular subtypes of gastric cancer. **Nat Genet** 2011; 43:1219-23.

Wang K, Yuen ST, Xu J, et al. Whole-genome sequencing and comprehensive molecular profiling identify new driver mutations in gastric cancer. **Nat Genet** 2014; 46:573-82.

Warren RL, Choe G, Freeman DJ, et al. Derivation of HLA types from shotgun sequence datasets. **Genome Med** 2012; 4:95.

Wilke H, Muro K, Van Cutsem E, et al. Ramucirumab plus paclitaxel versus placebo plus paclitaxel in patients with previously treated advanced gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (RAINBOW): A double-blind, randomised phase 3 trial. **Lancet Oncol** 2014; 15:1224-35.

Yang L, Wei S, Zhao R, Wu Y, Qiu H, Xiong H. Loss of ARID1A expression predicts poor survival prognosis in gastric cancer: a systematic meta-analysis from 14 studies. **Sci Rep** 2016; 6:28919.

Yoon C, Cho S-J, Aksoy BA, et al. Chemotherapy Resistance in Diffuse-Type Gastric Adenocarcinoma Is Mediated by RhoA Activation in Cancer Stem-Like Cells. **Clin Cancer Res** 2016; 22:971-983.

Yu H, Fang C, Chen L, et al. Worse prognosis in papillary, compared to tubular, early gastric carcinoma. **J Cancer** 2017; 8:117-23.

Zang ZJ, Cutcutache I, Poon SL, et al. Exome sequencing of gastric adenocarcinoma identifies recurrent somatic mutations in cell adhesion and chromatin remodeling genes. **Nat Genet** 2012; 44:570-4.

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



**A.C. Camargo  
Cancer Center**

**Comitê de Ética em  
Pesquisa - CEP**

São Paulo, 15 de dezembro de 2014.

**Ao**  
**Dr. Emmanuel Dias Neto**  
**Aluno: Helano Carioca Freitas (Doutorado)**

**Ref.: Projeto de Pesquisa n°. 1990/14**  
**“Avaliação do perfil de mutações somáticas em uma coorte de pacientes com adenocarcinoma gástrico”**

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 20/01/2015, após analisarem as respostas aos questionamentos realizados em reunião de 25/11/2014, aprovaram a realização do projeto (datado de 08 de janeiro de 2015) e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

- Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos;
- Termo de Compromisso do Pesquisador com Resoluções do Conselho Nacional de Saúde;
- Termo de Dispensa do Consentimento Livre e Esclarecido;
- Declaração sobre Uso e Destino do Material Biológico, Publicação dos Dados e Propriedades das Informações Geradas;
- Declaração sobre os Dados Coletados, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração sobre a Publicação dos Dados de Pesquisa Utilizando Amostras Fornecidas e Processadas pelo Biobanco do A. C. Camargo Cancer Center;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Biobanco;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Laboratório de Genômica Médica e Bioinformática;
- Declaração de Ciência do Departamento de Abdômen;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Anatomia Patológica;
- Declaração de Infraestrutura e Instalações do Centro Internacional de Pesquisa (CIPE);
- Orçamento Financeiro Detalhado.

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

Atenciosamente,

**Prof. Dr. Luiz Paulo Kowalski**  
**Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa**

1/1

## Apêndice 1 - Lista de genes do painel

<b>Símbolo</b>	<b>RefSeq</b>	<b>Gene</b>
ACVR2A	NM_001278579	Homo sapiens activin A receptor, type IIA (ACVR2A), transcript variant 1, mRNA
ALPK2	NM_052947	Homo sapiens alpha-kinase 2 (ALPK2), mRNA
APC	NM_000038	Homo sapiens adenomatous polyposis coli (APC), transcript variant 3, mRNA
ARHGAP20	NM_020809	Homo sapiens Rho GTPase activating protein 20 (ARHGAP20), transcript variant 1, mRNA
ARHGAP21	NM_020824	Homo sapiens Rho GTPase activating protein 21 (ARHGAP21), mRNA
ARHGAP5	NM_001030055	Homo sapiens Rho GTPase activating protein 5 (ARHGAP5), transcript variant 1, mRNA
ARHGEF28	NM_001080479	Homo sapiens Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 28 (ARHGEF28), transcript variant 1, mRNA
ARID1A	NM_006015	Homo sapiens AT rich interactive domain 1A (SWI-like)
ATM	NM_000051	Homo sapiens ataxia telangiectasia mutated (ATM), mRNA
B2M	NM_004048	Homo sapiens beta-2-microglobulin (B2M), mRNA
BCOR	NM_001123385	Homo sapiens BCL6 corepressor (BCOR), transcript variant 5, mRNA
BCORL1	NM_021946	Homo sapiens BCL6 corepressor-like 1 (BCORL1), mRNA
BNC2	NM_017637	Homo sapiens basonuclein 2 (BNC2), mRNA
BRCA2	NM_000059	Homo sapiens breast cancer 2, early onset (BRCA2), mRNA
BRIP1	NM_032043	Homo sapiens BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1 (BRIP1), mRNA
CDH1	NM_004360	Homo sapiens cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial) (CDH1), mRNA
CHRD	NM_003741	Homo sapiens chordin (CHRD), mRNA
CIC	NM_015125	Homo sapiens capicua transcriptional repressor (CIC), mRNA
CMYA5	NM_153610	Homo sapiens cardiomyopathy associated 5 (CMYA5), mRNA
COL5A1	NM_000093	Homo sapiens collagen, type V, alpha 1 (COL5A1), transcript variant 1, mRNA
CPD	NM_001304	Homo sapiens carboxypeptidase D (CPD), transcript variant 1, mRNA
CTCF	NM_006565	Homo sapiens CCCTC-binding factor (zinc finger protein) (CTCF), transcript variant 1, mRNA
CTNNA2	NM_001282597	Homo sapiens catenin (cadherin-associated protein), alpha 2 (CTNNA2), transcript variant 3, mRNA
CTNNB1	NM_001904	Homo sapiens catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa (CTNNB1), transcript variant 1, mRNA
CUL1	NM_003592	Homo sapiens cullin 1 (CUL1), mRNA
DCLK1	NM_004734	Homo sapiens doublecortin-like kinase 1 (DCLK1), transcript variant 1, mRNA
DNAH7	NM_018897	Homo sapiens dynein, axonemal, heavy chain 7 (DNAH7), mRNA
ECT2	NM_001258315	Homo sapiens epithelial cell transforming 2 (ECT2), transcript variant 1, mRNA
EGFR	NM_005228	Homo sapiens epidermal growth factor receptor (EGFR), transcript variant 1, mRNA
ELF3	NM_001114309	Homo sapiens E74-like factor 3 (ets domain transcription factor, epithelial-specific ) (ELF3), transcript variant 2, mRNA
EME2	NM_001257370	Homo sapiens essential meiotic endonuclease 1 homolog 2 (S. pombe) (EME2), mRNA
EP300	NM_001429	Homo sapiens E1A binding protein p300 (EP300), mRNA
ERBB2	NM_004448	Homo sapiens erb-b2 receptor tyrosine kinase 2 (ERBB2), transcript variant 1, mRNA
ERBB3	NM_001982	Homo sapiens v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3
FAT4	NM_001291303	Homo sapiens FAT atypical cadherin 4 (FAT4), transcript variant 1, mRNA
FBXO11	NM_001190274	Homo sapiens F-box protein 11 (FBXO11), transcript variant 4, mRNA
FBXW7	NM_033632	Homo sapiens F-box and WD repeat domain containing 7, E3 ubiquitin protein ligase (FBXW7), transcript variant 1, mRNA
FGFR1	NM_023110	Homo sapiens fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1), transcript variant 1, mRNA
FLG	NM_002016	Homo sapiens filaggrin (FLG), mRNA
FRMD4A	NM_018027	Homo sapiens FERM domain containing 4A (FRMD4A), mRNA
GLI3	NM_000168	Homo sapiens GLI family zinc finger 3 (GLI3), mRNA
GPR124	NM_032777	Homo sapiens G protein-coupled receptor 124 (GPR124), mRNA
HDAC4	NM_006037	Homo sapiens histone deacetylase 4
HIST1H1E	NM_005321	Homo sapiens histone cluster 1, H1e (HIST1H1E), mRNA
HLA-B	NM_005514	Homo sapiens major histocompatibility complex, class I, B (HLA-B), mRNA
IGF2BP3	NM_006547	Homo sapiens insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 3 (IGF2BP3), mRNA
IL2RG	NM_000206	Homo sapiens interleukin 2 receptor, gamma (IL2RG), mRNA
IL7R	NM_002185	Homo sapiens interleukin 7 receptor (IL7R), transcript variant 1, mRNA
IMPG2	NM_016247	Homo sapiens interphotoreceptor matrix proteoglycan 2 (IMPG2), mRNA
IRF2	NM_002199	Homo sapiens interferon regulatory factor 2 (IRF2), mRNA
IWS1	NM_017969	Homo sapiens IWS1 homolog (S. cerevisiae) (IWS1), mRNA
KIF13A	NM_022113	Homo sapiens kinesin family member 13A (KIF13A), transcript variant1, mRNA
KIF2B	NM_032559	Homo sapiens kinesin family member 2B (KIF2B), mRNA
KMT2C	NM_170606	Homo sapiens lysine (K)-specific methyltransferase 2C (KMT2C), mRNA
KRAS	NM_033360	Homo sapiens Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (KRAS), transcript variant a, mRNA
LAMA1	NM_005559	Homo sapiens laminin, alpha 1 (LAMA1), mRNA
LARP4B	NM_015155	Homo sapiens La ribonucleoprotein domain family, member 4B (LARP4B), mRNA
MACF1	AF317696	Homo sapiens macrophin 1 isoform 4 (MACF1) mRNA, complete cds

<b>Símbolo</b>	<b>RefSeq</b>	<b>Gene</b>
MAP2	NM_002374	Homo sapiens microtubule-associated protein 2 (MAP2), transcript variant 1, mRNA
MEDAG	NM_032849	Homo sapiens mesenteric estrogen-dependent adipogenesis (MEDAG), mRNA
MET	NM_001127500	Homo sapiens MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase (MET), transcript variant 1, mRNA
MSH6	NM_000179	Homo sapiens mutS homolog 6 (E. coli) (MSH6), mRNA
MUC6	NM_005961	Homo sapiens mucin 6, oligomeric mucus/gel-forming (MUC6), mRNA
MVK	NM_000431	Homo sapiens mevalonate kinase (MVK), transcript variant 1, mRNA
MYEOV	NM_001293291	Homo sapiens myeloma overexpressed (MYEOV), transcript variant 1, mRNA
NAA25	NM_024953	Homo sapiens N(alpha)-acetyltransferase 25, NatB auxiliary subunit (NAA25), mRNA
NBN	NM_002485	Homo sapiens nibrin (NBN), mRNA
NF1	NM_001042492	Homo sapiens neurofibromin 1 (NF1), transcript variant 1, mRNA
PALB2	NM_024675	Homo sapiens partner and localizer of BRCA2 (PALB2), mRNA
PAX6	NM_000280	Homo sapiens paired box 6 (PAX6), transcript variant 1, mRNA
PIK3CA	NM_006218	Homo sapiens phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha
PKHD1	NM_138694	Homo sapiens polycystic kidney and hepatic disease 1 (autosomal recessive) (PKHD1), transcript variant 1, mRNA
PKHD1L1	NM_177531	Homo sapiens polycystic kidney and hepatic disease 1 (autosomal recessive)-like 1 (PKHD1L1), mRNA
PTEN	NM_000314	Homo sapiens phosphatase and tensin homolog (PTEN), mRNA
PTPN23	NM_015466	Homo sapiens protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 23
PTPRC	NM_002838	Homo sapiens protein tyrosine phosphatase, receptor type, C(PTPRC), transcript variant 1, mRNA
RBM28	NM_018077	Homo sapiens RNA binding motif protein 28 (RBM28), transcript variant 1, mRNA
RHOA	NM_001664	Homo sapiens ras homolog family member A (RHOA), mRNA
RIMS2	NM_001100117	Homo sapiens regulating synaptic membrane exocytosis 2 (RIMS2), transcript variant 1, mRNA
RNF111	NM_001270528	Homo sapiens ring finger protein 111 (RNF111), transcript variant 1, mRNA
RNF43	NM_000546	Homo sapiens ring finger protein 43
RPL22	NM_000983	Homo sapiens ribosomal protein L22 (RPL22), mRNA
SERPINB8	NM_198833	Homo sapiens serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 8 (SERPINB8), transcript variant 2, mRNA
SMAD4	NM_005359	Homo sapiens SMAD family member 4 (SMAD4), mRNA
SMARCA4	NM_001128849	Homo sapiens SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 4 (SMARCA4), transcript variant 1, mRNA
SMARCB1	NM_003073	Homo sapiens SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily b, member 1 (SMARCB1), transcript variant 1, mRNA
SOHLH2	NM_017826	Homo sapiens spermatogenesis and oogenesis specific basic helix-loop-helix 2 (SOHLH2), transcript variant 1, mRNA
SPTA1	NM_003126	Homo sapiens spectrin, alpha erythrocytic 1 (SPTA1), mRNA
STARD13	NM_178006	Homo sapiens StAR-related lipid transfer (START) domain containing 13 (STARD13), transcript variant 1, mRNA
TBL1XR1	NM_024665	Homo sapiens transducin (beta)-like 1 X-linked receptor 1 (TBL1XR1), mRNA
TGFBR2	NM_001024847	Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor II(70/80kDa) (TGFBR2), transcript variant 1, mRNA
THBS1	NM_003246	Homo sapiens thrombospondin 1 (THBS1), mRNA
THSD7B	NM_001080427	Homo sapiens thrombospondin, type I, domain containing 7B (THSD7B), mRNA
TMEM63A	NM_014698	Homo sapiens transmembrane protein 63A (TMEM63A), mRNA
TP53	NM_000546	Homo sapiens tumor protein p53
VPS13A	NM_033305	Homo sapiens vacuolar protein sorting 13 homolog A
XRCC2	NM_005431	Homo sapiens X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 2 (XRCC2), mRNA
ZBTB20	NM_001164342	Homo sapiens zinc finger and BTB domain containing 20 (ZBTB20), transcript variant 1, mRNA.
ZIC4	NM_001168378	Homo sapiens Zic family member 4 (ZIC4), transcript variant 1, mRNA

## Apêndice 2 - Tabela de variantes (painel)

Hugo_Symbol	Tumor_Sample_Barcode	Chromosome	Start_Position	Reference_Allele	Tumor_Seq_Allele1	Tumor_Seq_Allele2	Exon_Number	Variant_Classification	Variant_Type	HGVSp_Short	t_depth	t_ref_count	t_alt_count	t_vaf	dbSNP_RS	PolyPhen	SIFT
ACVR2A	EST108T	2	148683687	A	A	-	10/11	Frame_Shift_Del	DEL	p.K437Rfs*5	671	284	387	0,58	novel		
ACVR2A	EST119T	2	148683687	A	A	-	10/11	Frame_Shift_Del	DEL	p.K437Rfs*5	314	134	178	0,57	novel		
ACVR2A	EST120T	2	148683687	A	A	-	10/11	Frame_Shift_Del	DEL	p.K437Rfs*5	193	115	78	0,40	novel		
ACVR2A	EST157T	2	148683687	A	A	-	10/11	Frame_Shift_Del	DEL	p.K437Rfs*5	197	127	70	0,36	novel		
ACVR2A	EST160T	2	148683642	G	G	A	10/11	Missense	SNP	p.G420D	242	199	39	0,16	novel	probably_damaging(0,998)	deleterious(0)
ACVR2A	EST167T	2	148677837	T	T	C	8/11	Missense	SNP	p.L334P	317	237	75	0,24	novel	probably_damaging(1)	deleterious(0)
ACVR2A	EST167T	2	148683687	A	A	-	10/11	Frame_Shift_Del	DEL	p.K437Rfs*5	253	166	87	0,34	novel		
ACVR2A	EST175T	2	148683687	A	A	-	10/11	Frame_Shift_Del	DEL	p.K437Rfs*5	458	340	106	0,23	novel		
ACVR2A	EST180T	2	148683687	A	A	-	10/11	Frame_Shift_Del	DEL	p.K437Rfs*5	286	239	47	0,16	novel		
ACVR2A	EST186T	2	148674942	C	C	T	6/11	Nonsense	SNP	p.R255*	458	365	93	0,20			
ACVR2A	EST186T	2	148683686	AA	AA	-	10/11	Frame_Shift_Del	DEL	p.K437Efs*19	515	421	94	0,18	novel		
ACVR2A	EST204T-A	2	148683687	A	A	-	10/11	Frame_Shift_Del	DEL	p.K437Rfs*5	256	82	174	0,68	novel		
ACVR2A	EST212T	2	148683687	A	A	-	10/11	Frame_Shift_Del	DEL	p.K437Rfs*5	316	78	238	0,75	novel		

Hugo_Symbol	Tumor_Sample_Barcode	Chromosome	Start_Position	Reference_Allele	Tumor_Seq_Allele1	Tumor_Seq_Allele2	Exon_Number	Variant_Classification	Variant_Type	HGVSp_Short	t_depth	t_ref_count	t_alt_count	t_vaf	dbSNP_RS	PolyPhen	SIFT
ACVR2A	EST46T-B	2	148683687	A	A	-	10/11	Frame_Shift_Del	DEL	p.K437Rfs*5	844	546	291	0,34	novel		
ACVR2A	EST48T	2	148683687	A	A	-	10/11	Frame_Shift_Del	DEL	p.K437Rfs*5	1048	602	446	0,43	novel		
ALPK2	EST108T	18	56247057	GGTT AG	GGT TAG	-	4/13	In_Frame_Del	DEL	p.L316_T317del	1205	747	458	0,38	rs570670198		
ALPK2	EST119T	18	56246930	C	C	T	4/13	Missense	SNP	p.D360N	380	172	208	0,55	rs140973320	benign(0,32)	deleterious(0,04)
ALPK2	EST122T-A	18	56205373	-	-	G	5/13	Frame_Shift_Ins	INS	p.F683lfs*38	204	108	96	0,47	rs561573547		
ALPK2	EST153T-B	18	56203010	C	C	T	5/13	Missense	SNP	p.S1470N	435	364	71	0,16	novel	benign(0,001)	tolerated(0,92)
ALPK2	EST157T	18	56204010	C	C	-	5/13	Frame_Shift_Del	DEL	p.V1137Sfs*72	266	198	68	0,26	rs202121224		
ALPK2	EST160T	18	56246440	T	T	-	4/13	Frame_Shift_Del	DEL	p.K523Rfs*15	193	162	31	0,16			
ALPK2	EST184T	18	56205373	-	-	G	5/13	Frame_Shift_Ins	INS	p.F683lfs*38	241	142	99	0,41	rs561573547		
ALPK2	EST196T	18	56184321	G	G	A	9/13	Missense	SNP	p.T1920M	491	429	62	0,13	rs372914995	probably_damaging(1)	deleterious(0)
ALPK2	EST202T	18	56203010	C	C	T	5/13	Missense	SNP	p.S1470N	328	176	152	0,46	novel	benign(0,001)	tolerated(0,92)
ALPK2	GCY6TU-B	18	56203629	C	C	T	5/13	Missense	SNP	p.G1264S	604	326	278	0,46	rs144733035	benign(0,004)	tolerated(0,11)
APC	EST111T-A	5	112174728	G	G	A	16/16	Missense	SNP	p.R1146H	179	46	133	0,74	rs763486328	probably_damaging(1)	
APC	EST157T	5	112157594	G	G	A	11/16	Missense	SNP	p.M438I	200	166	34	0,17	novel	benign(0,001)	
APC	EST157T	5	112173825	G	G	A	16/16	Missense	SNP	p.R845H	307	243	64	0,21	rs776878597	possibly_damaging(0,72)	
APC	EST157T	5	112178937	G	G	A	16/16	Missense	SNP	p.R2549H	325	269	54	0,17	rs199558585	probably_damaging(1)	

Hugo_Symbol	Tumor_Sample_Barcode	Chromosome	Start_Position	Reference_Allele	Tumor_Seq_Allele1	Tumor_Seq_Allele2	Exon_Number	Variant_Classification	Variant_Type	HGVSp_Short	t_depth	t_ref_count	t_alt_count	t_vaf	dbSNP_RS	PolyPhen	SIFT
APC	EST175T	5	112163657	G	G	C	13/16	Missense	SNP	p.R527T	317	158	159	0,50	novel	possibly_damaging(0,503)	
APC	EST180T	5	112179432	G	G	A	16/16	Missense	SNP	p.R2714H	349	238	111	0,32	rs747362422	benign(0,009)	
APC	EST186T	5	112175639	C	C	T	16/16	Nonsense	SNP	p.R1450*	484	284	197	0,41	rs121913332		
APC	EST195T	5	112175951	-	-	A	16/16	Frame_Shift_Ins	INS	p.T1556Nfs*3	209	93	116	0,56			
APC	EST197T	5	112154868	G	G	A	10/16	Missense	SNP	p.R380Q	350	188	162	0,46	rs587782886	probably_damaging(0,991)	
APC	EST209T	5	112175611	-	-	C	16/16	Frame_Shift_Ins	INS	p.P1442Tfs*13	449	353	77	0,17	novel		
APC	EST46T-B	5	112178198	G	G	A	16/16	Missense	SNP	p.G2303R	1690	767	918	0,54	rs544549596	probably_damaging(1)	
APC	GCY107T	5	112102107	G	G	T	3/16	Nonsense	SNP	p.E74*	13	7	6	0,46			
APC	GCY23M	5	112179815	T	T	G	16/16	Missense	SNP	p.S2842A	361	151	210	0,58	rs587780610	probably_damaging(0,997)	
ARHGAP20	EST153T-B	11	110485307	T	T	G	7/16	Missense	SNP	p.K203T	409	293	116	0,28	novel	probably_damaging(1)	deleterious(0,01)
ARHGAP20	EST158T	11	110582876	G	G	T	2/16	Missense	SNP	p.L27I	96	44	52	0,54	novel	benign(0)	tolerated(1)
ARHGAP20	EST167T	11	110454420	C	C	T	14/16	Missense	SNP	p.R486K	427	315	112	0,26	novel	benign(0,01)	tolerated(0,21)
ARHGAP20	EST167T	11	110582936	G	G	-	2/16	Frame_Shift_Del	DEL	p.Q7Sfs*5	137	95	42	0,31			
ARHGAP20	EST174T	11	110561274	T	T	C	3/16	Missense	SNP	p.T62A	257	129	126	0,49	rs11213538	benign(0,002)	deleterious(0,03)
ARHGAP20	EST184T	11	110450116	C	C	T	16/16	Missense	SNP	p.R1185K	363	187	176	0,48	novel	benign(0)	tolerated_low_confidence(0,59)
ARHGAP20	EST204T-A	11	110450161	G	G	A	16/16	Missense	SNP	p.T1170I	234	158	76	0,32	novel	benign(0,07)	tolerated_low_confidence(0,07)

Hugo_Symbol	Tumor_Sample_Barcode	Chromosome	Start_Position	Reference_Allele	Tumor_Seq_Allele1	Tumor_Seq_Allele2	Exon_Number	Variant_Classification	Variant_Type	HGVSp_Short	t_depth	t_ref_count	t_alt_count	t_vaf	dbSNP_RS	PolyPhen	SIFT
ARHGAP20	EST209T	11	110450596	G	G	A	16/16	Missense	SNP	p.S1025L	367	157	210	0,57	rs149310586	benign(0,014)	tolerated(0,15)
ARHGAP20	EST213T	11	110450141	T	T	C	16/16	Missense	SNP	p.T1177A	313	132	181	0,58	rs747625407	benign(0,004)	tolerated_low_confidence(0,41)
ARHGEF28	EST109T-B	5	73205609	C	C	G	34/37	Missense	SNP	p.R1512G	27	22	5	0,19	novel	probably_damaging(0,96)	deleterious(0)
ARHGEF28	EST110T	5	73045734	-	-	A	3/37	Nonsense	INS	p.Y36*	325	266	59	0,18	novel		
ARHGEF28	EST121T	5	73128202	C	C	T	10/37	Missense	SNP	p.S355L	196	109	87	0,44	rs375134188	benign(0,004)	deleterious(0,01)
ARHGEF28	EST121T	5	73128222	C	C	T	10/37	Missense	SNP	p.R362W	207	118	89	0,43	rs570816824	possibly_damaging(0,656)	deleterious(0)
ARHGEF28	EST121T	5	73136566	A	A	G	11/37	Missense	SNP	p.S470G	173	104	69	0,40	rs149883918	benign(0,004)	tolerated(0,43)
ARHGEF28	EST157T	5	73136431	A	A	G	11/37	Missense	SNP	p.S425G	308	253	53	0,17	novel	benign(0,001)	tolerated(0,39)
ARHGEF28	GCY107T	5	73072433	T	T	A	6/37	Missense	SNP	p.L251Q	135	112	23	0,17	novel	probably_damaging(0,996)	deleterious(0)
ARHGEF28	GCY107T	5	73142189	AAC	AAC	-	12/37	In_Frame_Del	DEL	p.R508_T509delinsE	208	186	22	0,11	novel		
ARID1A	EST108T	1	27024002	G	G	-	1/20	Frame_Shift_Del	DEL	p.Q372Sfs*19	74	65	9	0,12			
ARID1A	EST108T	1	27057877	C	C	G	3/20	Missense	SNP	p.Q529E	1574	1138	432	0,27		benign(0)	
ARID1A	EST108T	1	27101268	C	C	-	18/20	Frame_Shift_Del	DEL	p.Q1519Rfs*8	1680	1290	382	0,23	rs754673704		
ARID1A	EST110T	1	27057781	C	C	T	3/20	Nonsense	SNP	p.Q497*	288	222	66	0,23	novel		
ARID1A	EST119T	1	27105892	C	C	T	20/20	Nonsense	SNP	p.Q1835*	226	172	54	0,24			

Hugo_Symbol	Tumor_Sample_Barcode	Chromosome	Start_Position	Reference_Allele	Tumor_Seq_Allele1	Tumor_Seq_Allele2	Exon_Number	Variant_Classification	Variant_Type	HGVSp_Short	t_depth	t_ref_count	t_alt_count	t_vaf	dbSNP_RS	PolyPhen	SIFT
ARID1A	EST121T	1	27087397	GAGT CCTG	GAG TCC TG	-	5/20	Frame_Shift_Del	DEL	p.P659Efs*14	152	138	14	0,09	novel		
ARID1A	EST121T	1	27106354	C	C	T	20/20	Nonsense	SNP	p.R1989*	193	161	32	0,17			
ARID1A	EST149T	1	27057991	C	C	T	3/20	Nonsense	SNP	p.Q567*	75	62	13	0,17	novel		
ARID1A	EST151T	1	27092815	C	C	-	9/20	Frame_Shift_Del	DEL	p.P947Hfs*21	286	143	141	0,49	rs757303650		
ARID1A	EST157T	1	27023560	C	C	-	1/20	Frame_Shift_Del	DEL	p.P224Rfs*8	183	134	49	0,27	rs757919500		
ARID1A	EST157T	1	27106562	A	A	-	20/20	Frame_Shift_Del	DEL	p.N2059Tfs*76	280	231	49	0,18	novel		
ARID1A	EST161T	1	27023081	G	G	T	1/20	Missense	SNP	p.V63L	24	19	5	0,21	novel	unknown(0)	
ARID1A	EST164T	1	27023891	G	G	T	1/20	Missense	SNP	p.A333S	17	9	8	0,47		benign(0,058)	
ARID1A	EST167T	1	27100176	C	C	-	16/20	Frame_Shift_Del	DEL	p.P1326Rfs*155	164	91	40	0,24	rs377622327		
ARID1A	EST167T	1	27106804	C	C	-	20/20	Frame_Shift_Del	DEL	p.F2141Sfs*59	386	261	117	0,30			
ARID1A	EST175T	1	27089706	G	G	-	8/20	Frame_Shift_Del	DEL	p.G889Afs*2	465	404	61	0,13	novel		
ARID1A	EST182T	1	27105612	G	G	C	20/20	Missense	SNP	p.Q1741H	387	221	166	0,43	rs780068605	possibly_damaging(0,7)	
ARID1A	EST190T	1	27023303	C	C	G	1/20	Missense	SNP	p.H137D	43	33	10	0,23	novel	benign(0)	
ARID1A	EST204T-A	1	27024002	G	G	-	1/20	Frame_Shift_Del	DEL	p.Q372Sfs*19	18	9	9	0,50			
ARID1A	EST204T-A	1	27101416	-	-	C	18/20	Frame_Shift_Ins	INS	p.P1569Sfs*3	72	55	17	0,24	novel		
ARID1A	EST208T	1	27094445	-	-	T	11/20	Frame_Shift_Ins	INS	p.Y1052Lfs*53	186	102	84	0,45	novel		

Hugo_Symbol	Tumor_Sample_Barcode	Chromosome	Start_Position	Reference_Allele	Tumor_Seq_Allele1	Tumor_Seq_Allele2	Exon_Number	Variant_Classification	Variant_Type	HGVSp_Short	t_depth	t_ref_count	t_alt_count	t_vaf	dbSNP_RS	PolyPhen	SIFT
ARID1A	EST212T	1	27105931	-	-	G	20/20	Frame_Shift_Ins	INS	p.D1850Gfs*4	138	30	97	0,70	rs140055856		
ARID1A	EST216T	1	27023473	G	G	T	1/20	Missense	SNP	p.E193D	108	57	51	0,47	rs750489139	benign(0,01)	
ARID1A	EST216T	1	27023474	C	C	T	1/20	Missense	SNP	p.P194S	110	59	51	0,46	rs758730704	benign(0)	
ARID1A	EST43T-A	1	27023928	C	C	T	1/20	Missense	SNP	p.A345V	69	62	7	0,10	novel	benign(0,097)	
ARID1A	EST46T-B	1	27022998	C	C	T	1/20	Missense	SNP	p.A35V	108	52	52	0,48	novel	unknown(0)	
ARID1A	EST46T-B	1	27023327	C	C	-	1/20	Frame_Shift_Del	DEL	p.P146Qfs*86	648	534	114	0,18	novel		
ARID1A	EST46T-B	1	27105931	G	G	-	20/20	Frame_Shift_Del	DEL	p.D1850Tfs*33	1763	1538	222	0,13	rs140055856		
ARID1A	EST91T	1	27023818	C	C	-	1/20	Frame_Shift_Del	DEL	p.Q309Rfs*54	264	209	55	0,21	novel		
ARID1A	GCY107T	1	27089706	G	G	-	8/20	Frame_Shift_Del	DEL	p.G889Afs*2	105	95	10	0,10	novel		
ATM	EST109T-B	11	108160480	T	T	G	29/63	Missense	SNP	p.F1463C	227	114	113	0,50	rs138327406	probably_damaging(0,984)	deleterious(0)
ATM	EST154T	11	108114826	A	A	T	6/63	Nonsense	SNP	p.K215*	206	52	154	0,75	novel		
ATM	EST157T	11	108153552	T	T	C	25/63	Missense	SNP	p.L1231S	314	262	52	0,17	novel	possibly_damaging(0,821)	deleterious(0)
ATM	EST160T	11	108114817	T	T	-	6/63	Frame_Shift_Del	DEL	p.S214Pfs*16	329	288	41	0,12			
ATM	EST174T	11	108165669	C	C	A	32/63	Missense	SNP	p.L1598I	179	104	75	0,42	rs375190373	possibly_damaging(0,723)	deleterious(0,02)
ATM	EST178T	11	108198384	C	C	G	48/63	Missense	SNP	p.L2330V	342	215	127	0,37	rs148432863	benign(0,026)	tolerated(0,24)
ATM	EST186T	11	108205768	G	G	A	55/63	Missense	SNP	p.G2695S	535	405	130	0,24		probably_damaging(1)	deleterious(0)

Hugo_Symbol	Tumor_Sample_Barcode	Chromosome	Start_Position	Reference_Allele	Tumor_Seq_Allele1	Tumor_Seq_Allele2	Exon_Number	Variant_Classification	Variant_Type	HGVSp_Short	t_depth	t_ref_count	t_alt_count	t_vaf	dbSNP_RS	PolyPhen	SIFT
ATM	EST46T-B	11	108216476	-	-	A	58/63	Frame_Shift_Ins	INS	p.S2812Vfs*3	637	511	122	0,19	novel		
ATM	EST91T	11	108127035	G	G	C	14/63	Missense	SNP	p.A740P	1904	1539	361	0,19	novel	probably_damaging(0,928)	deleterious(0)
ATM	GCY107T	11	108124735	C	C	G	13/63	Nonsense	SNP	p.S698*	94	80	14	0,15	novel		
ATM	GCY107T	11	108186581	G	G	T	41/63	Missense	SNP	p.G2013V	238	204	34	0,14	novel	probably_damaging(0,999)	deleterious(0)
ATM	GCY113T	11	108163508	G	G	T	30/63	Missense	SNP	p.E1533D	317	275	42	0,13	novel	benign(0,017)	tolerated(0,43)
ATM	GCY6TU-B	11	108170554	G	G	T	34/63	Nonsense	SNP	p.E1707*	508	441	67	0,13	novel		
B2M	EST121T	15	45003745	A	A	G	1/4	translation_Start_Site	SNP	p.M1?	154	123	31	0,20		possibly_damaging(0,678)	deleterious(0)
B2M	EST175T	15	45007824	-	-	C	2/4	Frame_Shift_Ins	INS	p.T93Hfs*2	545	473	72	0,13	novel		
B2M	EST212T	15	45007681	T	T	C	2/4	Missense	SNP	p.L43P	482	303	179	0,37		probably_damaging(0,991)	deleterious(0,01)
B2M	EST46T-B	15	45003799	G	G	T	1/4	Nonsense	SNP	p.E19*	1253	1029	224	0,18			
B2M	EST46T-B	15	45007689	TA	TA	-	2/4	Frame_Shift_Del	DEL	p.Y46Cfs*10	2540	2265	273	0,11	novel		
BCOR	EST108T	X	39934126	-	-	T	4/15	Frame_Shift_Ins	INS	p.S158Kfs*28	1681	925	753	0,45	novel		
BCOR	EST120T	X	39932636	-	-	G	4/15	Frame_Shift_Ins	INS	p.R655Qfs*10	124	89	35	0,28	novel		
BCOR	EST140T1-1	X	39937121	C	T	T	2/15	Missense	SNP	p.R21H	31	0	31	1,00	rs778129253	probably_damaging(0,997)	deleterious_low_confidence(0)
BCOR	EST167T	X	39932085	G	G	-	4/15	Frame_Shift_Del	DEL	p.K839Sfs*17	162	74	88	0,54	rs147497014		
BCOR	GCY105T2	X	39933940	G	A	A	4/15	Missense	SNP	p.A220V	200	0	200	1,00	novel	possibly_damaging(0,643)	deleterious(0)

Hugo_Symbol	Tumor_Sample_Barcode	Chromosome	Start_Position	Reference_Allele	Tumor_Seq_Allele1	Tumor_Seq_Allele2	Exon_Number	Variant_Classification	Variant_Type	HGVSp_Short	t_depth	t_ref_count	t_alt_count	t_vaf	dbSNP_RS	PolyPhen	SIFT
BCOR	GCY107T	X	39931990	G	G	C	4/15	Missense	SNP	p.T870S	234	122	112	0,48	rs371981551	benign(0,001)	tolerated(0,58)
BCORL1	EST108T	X	129149721	G	G	A	3/12	Missense	SNP	p.M991I	1825	849	976	0,53	novel	benign(0,103)	
BCORL1	EST119T	X	129190011	C	C	-	12/12	Frame_Shift_Del	DEL	p.P1681Qfs*20	127	85	42	0,33	rs773050802,rs778658185		
BCORL1	EST137T	X	129148960	C	C	T	3/12	Missense	SNP	p.L738F	224	135	89	0,40	novel	benign(0,021)	
BCORL1	EST140T1-1	X	129148636	C	C	T	3/12	Missense	SNP	p.R630C	126	80	46	0,37		probably_damaging(0,994)	
BCORL1	EST160T	X	129190011	C	C	-	12/12	Frame_Shift_Del	DEL	p.P1681Qfs*20	163	134	29	0,18	rs773050802,rs778658185		
BCORL1	EST172T	X	129149380	A	G	G	3/12	Missense	SNP	p.S878G	166	0	166	1,00	rs139863820	benign(0,004)	
BCORL1	EST180T	X	129190011	C	C	-	12/12	Frame_Shift_Del	DEL	p.P1681Qfs*20	120	101	18	0,15	rs773050802,rs778658185		
BCORL1	EST193T	X	129147250	GTTG GAGA G	GTT GGA GAG	-	3/12	In_Frame_Del	DEL	p.V168_E170del	163	104	59	0,36	novel		
BCORL1	EST204T-A	X	129190011	C	C	-	12/12	Frame_Shift_Del	DEL	p.P1681Qfs*20	160	85	75	0,47	rs773050802,rs778658185		
BCORL1	EST212T	X	129190011	C	C	-	12/12	Frame_Shift_Del	DEL	p.P1681Qfs*20	101	35	66	0,65	rs773050802,rs778658185		
BCORL1	EST46T-B	X	129147713	C	C	T	3/12	Missense	SNP	p.P322L	1932	1576	356	0,18	novel	unknown(0)	
BNC2	EST137T	9	16436391	T	T	C	6/7	Missense	SNP	p.I601V	213	115	98	0,46	rs148257304	benign(0)	tolerated(1)
BNC2	GCY107T	9	16436161	G	G	C	6/7	Missense	SNP	p.H677Q	192	172	20	0,10	rs750492997	benign(0,221)	tolerated(0,63)

Hugo_Symbol	Tumor_Sample_Barcode	Chromosome	Start_Position	Reference_Allele	Tumor_Seq_Allele1	Tumor_Seq_Allele2	Exon_Number	Variant_Classification	Variant_Type	HGVSp_Short	t_depth	t_ref_count	t_alt_count	t_vaf	dbSNP_RS	PolyPhen	SIFT
BNC2	GCY107T	9	16436175	C	C	T	6/7	Missense	SNP	p.D673N	175	155	20	0,11	novel	benign(0,037)	tolerated(0,11)
BRCA2	EST106T	13	32937375	A	A	G	18/28	Missense	SNP	p.D2679G	1432	669	763	0,53	rs80359041	probably_damaging(1)	deleterious(0)
BRCA2	EST121T	13	32890650	G	G	A	2/28	Missense	SNP	p.R18H	194	99	95	0,49	rs80358762	possibly_damaging(0,747)	deleterious(0)
BRCA2	EST150T	13	32913454	T	T	-	11/28	Frame_Shift_Del	DEL	p.Y1655Tfs*15	450	271	179	0,40	novel		
BRCA2	EST150T	13	32921033	G	G	A	13/28	Missense	SNP	p.R2336H	214	175	38	0,18	rs28897743	possibly_damaging(0,517)	deleterious(0,01)
BRCA2	EST151T	13	32914817	G	G	A	11/28	Missense	SNP	p.V2109I	320	203	117	0,37	rs79456940	benign(0,021)	tolerated(0,73)
BRCA2	EST153T-B	13	32972525	C	C	T	27/28	Missense	SNP	p.P3292L	683	120	563	0,82	rs56121817	probably_damaging(0,971)	deleterious(0,04)
BRCA2	EST157T	13	32912345	-	-	A	11/28	Frame_Shift_Ins	INS	p.N1287Kfs*2	286	231	55	0,19	novel		
BRCA2	EST158T	13	32890650	G	G	A	2/28	Missense	SNP	p.R18H	237	95	142	0,60	rs80358762	possibly_damaging(0,747)	deleterious(0)
BRCA2	EST162T	13	32914277	A	A	G	11/28	Missense	SNP	p.I1929V	297	46	251	0,85	rs79538375	benign(0,03)	tolerated(0,74)
BRCA2	EST172T	13	32914277	A	A	G	11/28	Missense	SNP	p.I1929V	523	198	325	0,62	rs79538375	benign(0,03)	tolerated(0,74)
BRCA2	EST174T	13	32907098	G	G	A	10/28	Missense	SNP	p.A495T	211	108	103	0,49	rs80358437	benign(0,016)	tolerated(0,27)
BRCA2	EST199T	13	32954197	C	C	G	24/28	Missense	SNP	p.F3057L	443	218	225	0,51	rs747615055	probably_damaging(0,999)	tolerated(0,08)
BRCA2	EST205T	13	32937488	G	G	T	18/28	Missense	SNP	p.A2717S	535	325	210	0,39	rs28897747	benign(0,056)	tolerated(0,14)
BRCA2	EST46T-B	13	32954023	A	A	-	23/28	Frame_Shift_Del	DEL	p.T3033Lfs*29	821	710	102	0,12	rs762120301		

Hugo_Symbol	Tumor_Sample_Barcode	Chromosome	Start_Position	Reference_Allele	Tumor_Seq_Allele1	Tumor_Seq_Allele2	Exon_Number	Variant_Classification	Variant_Type	HGVSp_Short	t_depth	t_ref_count	t_alt_count	t_vaf	dbSNP_RS	PolyPhen	SIFT
BRCA2	EST46T-B	13	32969062	A	A	G	25/28	Missense	SNP	p.T3165A	1393	1204	189	0,14	rs587782568	benign(0,006)	tolerated(0,54)
BRCA2	EST48T	13	32920966	A	A	G	13/28	Missense	SNP	p.T2314A	901	495	406	0,45	novel	benign(0,084)	deleterious(0,05)
BRCA2	GCY107T	13	32893426	C	C	-	3/28	Frame_Shift_Del	DEL	p.P94Lfs*2	238	212	26	0,11	rs80358531		
BRCA2	GCY107T	13	32912202	C	C	A	11/28	Missense	SNP	p.A1237D	41	16	25	0,61	novel	probably_damaging(0,978)	deleterious(0)
BRCA2	GCY117T2	13	32969046	C	C	A	25/28	Missense	SNP	p.F3159L	355	172	183	0,52	rs80359221	benign(0,122)	tolerated(0,09)
BRIP1	EST180T	17	59820474	A	A	T	16/20	Missense	SNP	p.V760D	267	183	84	0,31	novel	probably_damaging(0,994)	deleterious(0)
BRIP1	EST188T	17	59761132	G	G	T	20/20	Missense	SNP	p.P1092Q	571	318	253	0,44	rs587780830	benign(0,01)	tolerated_low_confidence(0,59)
BRIP1	EST94T	17	59761132	G	G	T	20/20	Missense	SNP	p.P1092Q	1837	972	865	0,47	rs587780830	benign(0,01)	tolerated_low_confidence(0,59)
BRIP1	GCY107T	17	59821799	C	C	T	15/20	Missense	SNP	p.E751K	70	59	11	0,16	rs760438320	possibly_damaging(0,786)	deleterious(0,04)
CDH1	EST106T	16	68842728	A	A	G	5/16	Missense	SNP	p.R222G	948	799	149	0,16		probably_damaging(0,999)	deleterious(0)
CDH1	EST139T1	16	68842633	A	A	G	5/16	Missense	SNP	p.Y190C	257	208	49	0,19		probably_damaging(1)	deleterious(0)
CDH1	EST150T	16	68772276	C	C	A	2/16	Missense	SNP	p.P42H	36	30	6	0,17	novel	benign(0,056)	tolerated(0,24)
CDH1	EST157T	16	68849545	C	C	-	10/16	Frame_Shift_Del	DEL	p.I485Sfs*37	248	198	50	0,20	novel		
CDH1	EST160T	16	68835781	C	C	-	3/16	Frame_Shift_Del	DEL	p.P126Rfs*89	188	164	24	0,13			
CDH1	EST193T	16	68847238	-	-	CGAGC	9/16	Frame_Shift_Ins	INS	p.N390Rfs*5	187	164	22	0,12	novel		
CDH1	EST98T	16	68842678	T	T	C	5/16	Missense	SNP	p.F205S	1398	1134	264	0,19	novel	probably_damaging(1)	deleterious(0)

Hugo_Symbol	Tumor_Sample_Barcode	Chromosome	Start_Position	Reference_Allele	Tumor_Seq_Allele1	Tumor_Seq_Allele2	Exon_Number	Variant_Classification	Variant_Type	HGVSp_Short	t_depth	t_ref_count	t_alt_count	t_vaf	dbSNP_RS	PolyPhen	SIFT
CDH1	GCY117T2	16	68853328	G	G	-	11/16	Frame_Shift_Del	DEL		251	210	41	0,16			
CDH1	GCY90T	16	68771347	-	-	GCT	1/16	In_Frame_Ins	INS	p.L15dup	176	126	47	0,27	novel		
CHRD	EST108T	3	184105224	C	C	-	19/23	Frame_Shift_Del	DEL	p.F806Lfs*3	1678	1285	389	0,23	novel		
CHRD	EST109T-B	3	184104413	C	C	G	16/23	Missense	SNP	p.A689G	110	62	48	0,44	rs372203346	benign(0,007)	tolerated(0,36)
CHRD	EST119T	3	184100912	C	C	T	10/23	Missense	SNP	p.R392C	43	37	6	0,14	rs543627744	probably_damaging(0,961)	deleterious(0)
CHRD	EST161T	3	184103874	G	G	A	15/23	Missense	SNP	p.R620Q	112	53	59	0,53	rs376244825	benign(0,011)	tolerated(0,77)
CHRD	EST196T	3	184102361	G	G	T	13/23	Missense	SNP	p.A493S	90	80	10	0,11	novel	possibly_damaging(0,676)	tolerated(0,06)
CHRD	EST48T	3	184105224	C	C	-	19/23	Frame_Shift_Del	DEL	p.F806Lfs*3	1017	812	205	0,20	novel		
CIC	EST112T	19	42776194	C	C	A	2/21	Missense	SNP	p.P87T	44	33	11	0,25	novel	possibly_damaging(0,81)	
CIC	EST116T	19	42799176	G	G	T	20/20	Missense	SNP	p.A1554S	23	18	5	0,22	rs762480443	unknown(0)	
CIC	EST118T	19	42796985	C	C	T	14/20	Missense	SNP	p.P1148L	156	112	44	0,28	rs758868794	probably_damaging(0,982)	
CIC	EST119T	19	42776954	-	-	C	2/21	Frame_Shift_Ins	INS	p.W343Lfs*4	26	14	12	0,46	novel		
CIC	EST133T	19	42796600	G	G	A	13/20	Missense	SNP	p.V1053M	58	28	30	0,52	rs773634795	probably_damaging(0,971)	
CIC	EST135T1	19	42791706	G	G	A	5/20	Missense	SNP	p.D198N	123	86	37	0,30	novel	possibly_damaging(0,512)	
CIC	EST136T	19	42776236	C	C	T	2/21	Missense	SNP	p.R101C	184	90	94	0,51	novel	possibly_damaging(0,833)	
CIC	EST140T1-1	19	42791175	G	G	T	3/20	Missense	SNP	p.A79S	27	22	5	0,19	novel	benign(0,097)	

Hugo_Symbol	Tumor_Sample_Barcode	Chromosome	Start_Position	Reference_Allele	Tumor_Seq_Allele1	Tumor_Seq_Allele2	Exon_Number	Variant_Classification	Variant_Type	HGVSp_Short	t_depth	t_ref_count	t_alt_count	t_vaf	dbSNP_RS	PolyPhen	SIFT
CIC	EST150T	19	42776305	G	G	C	2/21	Missense	SNP	p.E124Q	147	122	25	0,17	novel	possibly_damaging(0,617)	
CIC	EST160T	19	42797376	C	C	-	15/20	Frame_Shift_Del	DEL	p.P1248Hfs*54	88	74	14	0,16	rs769228468		
CIC	EST167T	19	42797376	C	C	-	15/20	Frame_Shift_Del	DEL	p.P1248Hfs*54	141	103	38	0,27	rs769228468		
CIC	EST170T	19	42776360	G	G	A	2/21	Missense	SNP	p.R142Q	129	74	55	0,43	novel	benign(0)	
CIC	EST180T	19	42798142	C	C	T	17/20	Missense	SNP	p.R1366W	164	141	23	0,14	novel	probably_damaging(0,963)	
CIC	EST182T	19	42777422	AGTT CAAC GGC AAGC	AGT TCA ACG GCA AGC	-	2/21	In_Frame_Del	DEL	p.F497_Q501del	221	194	27	0,12	novel		
CIC	EST185T	19	42788915	G	G	A	1/20	Missense	SNP	p.G20D	34	29	5	0,15	novel	possibly_damaging(0,813)	
CIC	EST193T	19	42776954	-	-	C	2/21	Frame_Shift_Ins	INS	p.W343Lfs*4	112	96	16	0,14	novel		
CIC	EST204T-A	19	42796882	-	-	C	14/20	Frame_Shift_Ins	INS	p.S1117Kfs*34	155	101	54	0,35	rs761345552		
CIC	EST212T	19	42778294	C	C	-	2/21	Frame_Shift_Del	DEL	p.P788Lfs*4	177	98	71	0,40	novel		
CIC	EST212T	19	42795085	C	C	T	10/20	Missense	SNP	p.P722L	289	156	133	0,46	rs751548523	probably_damaging(0,982)	
CIC	EST213T	19	42776141	G	G	A	2/21	Missense	SNP	p.R69Q	78	29	49	0,63	rs188464728	benign(0)	
CIC	EST213T	19	42776500	C	C	A	2/21	Missense	SNP	p.P189T	89	59	30	0,34	rs543498277	possibly_damaging(0,81)	
CIC	EST48T	19	42796484	C	C	T	13/20	Missense	SNP	p.A1014V	703	557	146	0,21	rs780624177	benign(0,018)	
CIC	GCY107T	19	42778612	T	T	C	2/21	Missense	SNP	p.F893L	1168	484	684	0,59	rs767308169	benign(0,097)	

Hugo_Symbol	Tumor_Sample_Barcode	Chromosome	Start_Position	Reference_Allele	Tumor_Seq_Allele1	Tumor_Seq_Allele2	Exon_Number	Variant_Classification	Variant_Type	HGVSp_Short	t_depth	t_ref_count	t_alt_count	t_vaf	dbSNP_RS	PolyPhen	SIFT
CMYA5	EST108T	5	79026169	AGA	AGA	-	2/13	In_Frame_Del	DEL	p.E530del	1717	1310	407	0,24	rs777250780		
CMYA5	EST116T	5	79032780	A	A	G	2/13	Missense	SNP	p.H2731R	462	231	230	0,50	rs201597133	unknown(0)	
CMYA5	EST120T	5	79026059	C	C	T	2/13	Missense	SNP	p.P491S	445	367	78	0,18	novel	possibly_damaging(0,857)	
CMYA5	EST160T	5	79026779	A	A	G	2/13	Missense	SNP	p.I731V	471	415	56	0,12		benign(0)	
CMYA5	EST163T-B	5	79031066	A	A	G	2/13	Missense	SNP	p.K2160E	372	191	181	0,49	rs182795650	probably_damaging(0,956)	
CMYA5	EST163T-B	5	79035095	G	G	C	2/13	Missense	SNP	p.E3503Q	346	185	161	0,47	rs148631314	probably_damaging(0,968)	
CMYA5	EST163T-B	5	79035178	C	C	G	2/13	Missense	SNP	p.H3530Q	326	181	145	0,44	novel	probably_damaging(0,998)	
CMYA5	EST180T	5	79029413	-	-	A	2/13	Frame_Shift_Ins	INS	p.Q1611Tfs*13	338	296	42	0,12	novel		
CMYA5	EST180T	5	79029927	C	C	T	2/13	Missense	SNP	p.A1780V	303	175	128	0,42	novel	benign(0,054)	
CMYA5	EST188T	5	79041099	A	A	T	4/13	Nonsense	SNP	p.K3597*	254	146	108	0,43	rs185458523		
CMYA5	EST189T	5	79034825	C	C	T	2/13	Missense	SNP	p.R3413C	524	308	211	0,40	rs149453588	benign(0,041)	
CMYA5	EST206T	5	78985734	G	G	T	1/13	Missense	SNP	p.A2S	35	30	5	0,14	novel	possibly_damaging(0,739)	
CMYA5	EST43T-A	5	79026860	A	A	T	2/13	Missense	SNP	p.T758S	2231	1392	837	0,38	rs369615786	benign(0,011)	
CMYA5	GCY107T	5	79025474	G	G	-	2/13	Frame_Shift_Del	DEL	p.V296*	34	26	8	0,24	novel		
CMYA5	GCY107T	5	79025475	T	T	A	2/13	Missense	SNP	p.V296E	34	26	8	0,24	novel	benign(0,044)	
CMYA5	GCY107T	5	79029922	G	G	T	2/13	Missense	SNP	p.L1778F	283	227	56	0,20	novel	possibly_damaging(0,879)	
CMYA5	GCY107T	5	79029923	A	A	T	2/13	Nonsense	SNP	p.K1779*	283	227	56	0,20	novel		

Hugo_Symbol	Tumor_Sample_Barcode	Chromosome	Start_Position	Reference_Allele	Tumor_Seq_Allele1	Tumor_Seq_Allele2	Exon_Number	Variant_Classification	Variant_Type	HGVSp_Short	t_depth	t_ref_count	t_alt_count	t_vaf	dbSNP_RS	PolyPhen	SIFT
CMYA5	GCY107T	5	79029968	A	A	T	2/13	Missense	SNP	p.T1794S	123	80	43	0,35	novel	probably_damaging(0,935)	
CMYA5	GCY107T	5	79030665	C	C	A	2/13	Missense	SNP	p.T2026K	66	52	14	0,21	novel	benign(0,026)	
COL5A1	EST119T	9	137701128	G	G	A	43/66	Missense	SNP	p.G1156R	47	39	8	0,17		unknown(0)	
COL5A1	EST119T	9	137717671	C	C	-	63/66	Frame_Shift_Del	DEL	p.R1664Gfs*65	60	50	10	0,17	novel		
COL5A1	EST120T	9	137688262	C	C	T	35/66	Missense	SNP	p.R948W	171	149	22	0,13	novel	unknown(0)	
COL5A1	EST135T1	9	137534059	C	C	G	1/66	Missense	SNP	p.A9G	28	24	4	0,14	novel	benign(0,305)	
COL5A1	EST153T-B	9	137534099	GCT	GCT	-	1/66	In_Frame_Del	DEL	p.L28del	11	9	2	0,18	rs773994971		
COL5A1	EST157T	9	137646161	C	C	T	16/66	Missense	SNP	p.P606S	75	58	17	0,23	novel	probably_damaging(0,926)	
COL5A1	EST158T	9	137715275	C	C	A	61/66	Missense	SNP	p.P1553Q	85	71	14	0,16	rs530570306	unknown(0)	
COL5A1	EST172T	9	137705863	C	C	T	49/66	Missense	SNP	p.P1296L	22	16	6	0,27	rs771130127	unknown(0)	
COL5A1	EST181T	9	137534099	GCT	GCT	-	1/66	In_Frame_Del	DEL	p.L28del	13	9	4	0,31	rs773994971		
COL5A1	EST181T	9	137726835	G	G	A	65/66	Missense	SNP	p.E1719K	148	57	91	0,61	rs776640704	unknown(0)	
COL5A1	EST190T	9	137705844	G	G	A	49/66	Missense	SNP	p.A1290T	24	17	7	0,29	novel	unknown(0)	
COL5A1	EST204T-A	9	137676844	G	G	A	30/66	Missense	SNP	p.G832S	73	45	28	0,38	rs373692912	unknown(0)	
COL5A1	EST204T-A	9	137705844	G	G	A	49/66	Missense	SNP	p.A1290T	30	15	15	0,50	novel	unknown(0)	
COL5A1	EST89T	9	137534099	GCT	GCT	-	1/66	In_Frame_Del	DEL	p.L28del	58	51	7	0,12	rs773994971		

Hugo_Symbol	Tumor_Sample_Barcode	Chromosome	Start_Position	Reference_Allele	Tumor_Seq_Allele1	Tumor_Seq_Allele2	Exon_Number	Variant_Classification	Variant_Type	HGVSp_Short	t_depth	t_ref_count	t_alt_count	t_vaf	dbSNP_RS	PolyPhen	SIFT
COL5A1	EST89T	9	137534119	G	G	T	1/66	Missense	SNP	p.W29L	57	50	7	0,12	novel	benign(0,441)	
CPD	EST121T	17	28706114	C	C	T	1/21	Missense	SNP	p.A39V	69	19	50	0,72	rs184488188	benign(0,024)	tolerated_low_confidence(0,24)
CPD	EST121T	17	28776750	A	A	G	13/21	Missense	SNP	p.N1018S	226	173	50	0,22	rs774460272	possibly_damaging(0,646)	deleterious(0,04)
CPD	EST133T	17	28706056	A	A	G	1/21	Missense	SNP	p.M20V	97	66	31	0,32	novel	benign(0)	tolerated_low_confidence(0,37)
CPD	EST140T1-1	17	28783362	T	T	G	16/21	Missense	SNP	p.N1142K	182	57	125	0,69	novel	probably_damaging(0,99)	tolerated(0,15)
CPD	EST157T	17	28789036	A	A	G	19/21	Missense	SNP	p.N1258D	448	362	82	0,18	novel	benign(0,097)	tolerated(0,24)
CPD	EST162T	17	28749793	C	C	G	5/21	Missense	SNP	p.T470R	312	189	123	0,39	rs192520453	benign(0,103)	tolerated(0,18)
CPD	EST167T	17	28706680	-	-	A	1/21	Frame_Shift_Ins	INS	p.P229Tfs*40	138	106	32	0,23	novel		
CPD	EST167T	17	28766084	A	A	G	9/21	Missense	SNP	p.Y740C	175	116	59	0,34	novel	probably_damaging(0,992)	deleterious(0)
CPD	EST170T	17	28706368	C	C	T	1/21	Missense	SNP	p.P124S	61	52	9	0,15	novel	benign(0,011)	tolerated(0,74)
CPD	EST196T	17	28706368	C	C	T	1/21	Missense	SNP	p.P124S	87	16	71	0,82	novel	benign(0,011)	tolerated(0,74)
CPD	EST212T	17	28706682	-	-	C	1/21	Frame_Shift_Ins	INS	p.A231Rfs*38	128	84	37	0,29	novel		
CPD	EST214T	17	28791746	A	A	G	21/21	Missense	SNP	p.T1353A	363	186	173	0,48	rs115003383	possibly_damaging(0,536)	tolerated_low_confidence(0,13)
CPD	EST216T	17	28706114	C	C	T	1/21	Missense	SNP	p.A39V	124	80	44	0,35	rs184488188	benign(0,024)	tolerated_low_confidence(0,24)
CPD	EST216T	17	28706630	G	G	T	1/21	Missense	SNP	p.S211I	185	137	48	0,26	rs775875206	possibly_damaging(0,616)	deleterious(0,01)
CPD	EST48T	17	28706682	-	-	C	1/21	Frame_Shift_Ins	INS	p.A231Rfs*38	945	791	133	0,14	novel		
CPD	EST97T	17	28758807	T	T	A	8/21	Missense	SNP	p.Y679N	2397	892	1505	0,63	novel	probably_damaging(1)	deleterious(0)

Hugo_Symbol	Tumor_Sample_Barcode	Chromosome	Start_Position	Reference_Allele	Tumor_Seq_Allele1	Tumor_Seq_Allele2	Exon_Number	Variant_Classification	Variant_Type	HGVSp_Short	t_depth	t_ref_count	t_alt_count	t_vaf	dbSNP_RS	PolyPhen	SIFT
CPD	EST98T	17	28772986	G	G	C	12/21	Missense	SNP	p.E941Q	2308	1141	1167	0,51	rs201995465	possibly_damaging(0,906)	tolerated(0,25)
CPD	GCY113T	17	28754429	G	G	A	7/21	Missense	SNP	p.G624S	414	367	47	0,11	novel	probably_damaging(1)	deleterious(0)
CTCF	EST157T	16	67662361	A	A	G	9/12	Missense	SNP	p.Q536R	317	241	73	0,23	novel	benign(0,298)	deleterious(0,02)
CTCF	EST160T	16	67671654	-	-	A	12/12	Frame_Shift_Ins	INS	p.E691Rfs*5	157	121	35	0,22	novel		
CTCF	EST189T	16	67670671	A	A	G	11/12	Missense	SNP	p.Q639R	153	87	66	0,43	novel	benign(0,003)	tolerated_low_confidence(0,43)
CTCF	EST204T-A	16	67645338	-	-	A	3/12	Frame_Shift_Ins	INS	p.T204Nfs*26	162	109	53	0,33			
CTCF	EST46T-B	16	67645338	-	-	A	3/12	Frame_Shift_Ins	INS	p.T204Nfs*26	2063	1776	272	0,13			
CTCF	GCY107T	16	67662337	G	G	T	9/12	Missense	SNP	p.C528F	101	83	18	0,18	rs761300040	probably_damaging(0,953)	deleterious(0)
CTNNA2	EST101T	2	80101274	C	C	A	10/22	Missense	SNP	p.L220M	1139	967	172	0,15	novel	probably_damaging(0,999)	deleterious(0,04)
CTNNA2	EST154T	2	79878741	G	G	A	6/22	Missense	SNP	p.R20Q	298	252	46	0,15		possibly_damaging(0,903)	tolerated(0,19)
CTNNA2	EST156T-A	2	80835336	T	T	G	21/22	Missense	SNP	p.L775V	266	207	59	0,22	novel	possibly_damaging(0,874)	deleterious(0,01)
CTNNA2	EST161T	2	79971637	A	A	G	7/22	Missense	SNP	p.E76G	216	148	68	0,31	novel	benign(0,287)	deleterious(0,03)
CTNNA2	EST182T	2	80801408	G	G	A	17/22	Missense	SNP	p.R621Q	336	293	43	0,13	rs753270694	benign(0,249)	tolerated(0,18)
CTNNA2	EST192T	2	80620418	T	T	C		Splice_Site	SNP	p.X379_splice	57	50	7	0,12			
CTNNA2	EST196T	2	79878704	A	A	G	6/22	Missense	SNP	p.I8V	450	287	163	0,36	rs774611614	benign(0,002)	tolerated(0,34)
CTNNA2	EST48T	2	80801408	G	G	A	17/22	Missense	SNP	p.R621Q	1051	840	211	0,20	rs753270694	benign(0,249)	tolerated(0,18)

Hugo_Symbol	Tumor_Sample_Barcode	Chromosome	Start_Position	Reference_Allele	Tumor_Seq_Allele1	Tumor_Seq_Allele2	Exon_Number	Variant_Classification	Variant_Type	HGVSp_Short	t_depth	t_ref_count	t_alt_count	t_vaf	dbSNP_RS	PolyPhen	SIFT
CTNNA2	GCY107T	2	80101380	CC	CC	-	10/22	Frame_Shift_Del	DEL	p.S255*	204	169	35	0,17	novel		
CTNNA2	GCY107T	2	80782967	-	-	T	16/22	Frame_Shift_Ins	INS	p.G564Vfs*5	163	137	26	0,16	novel		
CTNNA2	GCY107T	2	80808864	G	G	A	18/22	Missense	SNP	p.E643K	45	38	7	0,16	novel	probably_damaging(0,959)	deleterious(0,04)
CTNNB1	EST110T	3	41277290	C	C	T	11/15	Nonsense	SNP	p.R587*	430	378	52	0,12	novel		
CTNNB1	EST166T	3	41266113	C	C	T	3/15	Missense	SNP	p.S37F	216	172	44	0,20	rs121913403	probably_damaging(0,962)	deleterious(0)
CTNNB1	EST188T	3	41266682	T	T	C	4/15	Missense	SNP	p.L160P	415	305	110	0,27	novel	probably_damaging(0,995)	deleterious(0)
CTNNB1	EST203T	3	41278160	C	C	-	13/15	Frame_Shift_Del	DEL	p.S680Afs*55	300	271	29	0,10	novel		
CTNNB1	EST216T	3	41266125	C	C	T	3/15	Missense	SNP	p.T41I	405	325	80	0,20	rs121913413	probably_damaging(0,931)	deleterious(0)
CUL1	EST157T	7	148494936	A	A	-	18/22	Frame_Shift_Del	DEL	p.K645Sfs*19	273	223	50	0,18	novel		
CUL1	EST46T-B	7	148481063	G	G	T	11/22	Missense	SNP	p.A398S	2787	2393	392	0,14	novel	probably_damaging(0,999)	deleterious(0)
DCLK1	EST111T-A	13	36428695	G	G	A	6/18	Missense	SNP	p.R326C	161	101	60	0,37		possibly_damaging(0,835)	deleterious(0)
DCLK1	EST120T	13	36686015	A	A	T	3/18	Missense	SNP	p.D238E	327	272	53	0,16	rs774453534	unknown(0)	tolerated(0,22)
DCLK1	EST151T	13	36686247	C	C	T	3/18	Missense	SNP	p.R161Q	393	328	61	0,16		unknown(0)	tolerated(0,16)
DCLK1	EST157T	13	36521571	A	A	-	4/18	Frame_Shift_Del	DEL	p.F249Lfs*23	197	168	29	0,15	rs764087183		
DCLK1	EST176T	13	36410222	C	C	T	8/18	Missense	SNP	p.G393R	414	246	168	0,41		probably_damaging(0,98)	deleterious(0,02)
DCLK1	EST217T	13	36700066	T	T	A	2/18	Missense	SNP	p.K70I	339	278	61	0,18	novel	unknown(0)	deleterious(0)

Hugo_Symbol	Tumor_Sample_Barcode	Chromosome	Start_Position	Reference_Allele	Tumor_Seq_Allele1	Tumor_Seq_Allele2	Exon_Number	Variant_Classification	Variant_Type	HGVSp_Short	t_depth	t_ref_count	t_alt_count	t_vaf	dbSNP_RS	PolyPhen	SIFT
DCLK1	EST43T-A	13	36385021	C	C	G	12/18	Missense	SNP	p.V547L	1532	1253	279	0,18	novel	benign(0,198)	deleterious(0,02)
DCLK1	GCY107T	13	36700148	G	G	T	2/18	Missense	SNP	p.R43S	196	160	36	0,18	novel	unknown(0)	deleterious(0)
ECT2	EST140T1-1	3	172525604	C	C	G	22/25	Missense	SNP	p.Q764E	285	169	110	0,39	rs749355627	benign(0,04)	tolerated(0,79)
ECT2	EST157T	3	172523623	C	C	G	21/25	Missense	SNP	p.Q737E	225	178	47	0,21	novel	probably_damaging(0,974)	tolerated(0,11)
ECT2	EST204T-A	3	172500008	T	T	-	15/25	Frame_Shift_Del	DEL	p.L537*	218	128	90	0,41	novel		
ECT2	GCY107T	3	172472414	G	G	T	2/25	Nonsense	SNP	p.E32*	92	56	36	0,39	novel		
ECT2	GCY107T	3	172478000	A	A	-	7/25	Frame_Shift_Del	DEL	p.N211fs*21	73	55	18	0,25	novel		
ECT2	GCY107T	3	172479401	T	T	G	8/25	Missense	SNP	p.V229G	52	28	24	0,46	novel	benign(0,082)	deleterious(0,04)
EGFR	EST101T	7	55221825	C	C	T	7/28	Missense	SNP	p.T290I	1571	804	767	0,49	novel	benign(0,115)	tolerated(0,33)
EGFR	EST120T	7	55238900	C	C	T	16/28	Missense	SNP	p.T638M	264	222	41	0,16	rs571064657	benign(0)	tolerated(0,11)
EGFR	EST162T	7	55269456	C	C	T	26/28	Missense	SNP	p.A1048V	261	149	112	0,43	rs78244461	benign(0,002)	tolerated(0,28)
EGFR	EST167T	7	55225358	T	T	-	11/28	Frame_Shift_Del	DEL	p.L405Cfs*2	361	260	101	0,28	rs777165081		
EGFR	EST215T	7	55273029	G	G	A	28/28	Missense	SNP	p.A1118T	213	98	115	0,54	rs770749711	benign(0,003)	tolerated(0,55)
EGFR	EST216T	7	55269456	C	C	T	26/28	Missense	SNP	p.A1048V	267	156	111	0,42	rs78244461	benign(0,002)	tolerated(0,28)
ELF3	EST167T	1	201983095	G	G	-	7/8	Frame_Shift_Del	DEL	p.G316Afs*9	179	127	52	0,29	novel		
ELF3	EST47T-B	1	201981202	GAT	GAT	-	2/8	In_Frame_Del	DEL	p.C95del	2568	2345	221	0,09	novel		

Hugo_Symbol	Tumor_Sample_Barcode	Chromosome	Start_Position	Reference_Allele	Tumor_Seq_Allele1	Tumor_Seq_Allele2	Exon_Number	Variant_Classification	Variant_Type	HGVSp_Short	t_depth	t_ref_count	t_alt_count	t_vaf	dbSNP_RS	PolyPhen	SIFT
ELF3	EST48T	1	201983097	G	G	A	7/8	Missense	SNP	p.G316S	1461	1076	385	0,26	novel	probably_damaging(1)	deleterious(0)
ELF3	EST98T	1	201982403	T	T	A	6/8	Missense	SNP	p.L261H	1391	671	716	0,51	novel	possibly_damaging(0,907)	deleterious(0)
EME2	EST157T	16	1826153	C	C	T	8/8	Missense	SNP	p.R352C	159	133	26	0,16	rs751607323	probably_damaging(0,984)	deleterious(0)
EME2	EST167T	16	1823445	C	C	G	1/8	Missense	SNP	p.L73V	50	43	7	0,14	rs766464153	benign(0,057)	tolerated(0,17)
EME2	EST213T	16	1823757	T	T	C	2/8	Missense	SNP	p.L100P	14	11	3	0,21	novel	probably_damaging(0,972)	deleterious(0)
EP300	EST112T	22	41572490	C	C	A	30/31	Nonsense	SNP	p.C1673*	34	29	5	0,15	novel		
EP300	EST118T	22	41574770	T	T	G	31/31	Missense	SNP	p.V2352G	266	138	128	0,48	novel	probably_damaging(0,927)	
EP300	EST157T	22	41546188	C	C	T	14/31	Nonsense	SNP	p.Q935*	126	103	23	0,18	novel		
EP300	EST157T	22	41566520	G	G	T	27/31	Missense	SNP	p.W1466L	240	202	38	0,16		probably_damaging(1)	
EP300	EST167T	22	41565529	G	G	A	26/31	Missense	SNP	p.D1399N	258	211	47	0,18		probably_damaging(1)	
EP300	EST204T-A	22	41574679	C	C	-	31/31	Frame_Shift_Del	DEL	p.H2324Tfs*29	83	42	41	0,49			
EP300	EST46T-B	22	41574780	G	G	T	31/31	Missense	SNP	p.Q2355H	1789	1532	257	0,14	novel	possibly_damaging(0,648)	
EP300	EST48T	22	41572924	C	C	T	31/31	Missense	SNP	p.R1737C	1763	1352	411	0,23		probably_damaging(0,955)	
EP300	EST98T	22	41546053	A	A	C	14/31	Missense	SNP	p.T890P	2773	1442	1331	0,48	rs577396026	unknown(0)	
EP300	GCY117T2	22	41551061	G	G	A	17/31	Missense	SNP	p.D1069N	593	464	129	0,22	novel	probably_damaging(0,937)	

Hugo_Symbol	Tumor_Sample_Barcode	Chromosome	Start_Position	Reference_Allele	Tumor_Seq_Allele1	Tumor_Seq_Allele2	Exon_Number	Variant_Classification	Variant_Type	HGVSp_Short	t_depth	t_ref_count	t_alt_count	t_vaf	dbSNP_RS	PolyPhen	SIFT
ERBB2	EST120T	17	37879658	G	G	A	17/27	Missense	SNP	p.R678Q	214	132	82	0,38		benign(0,022)	tolerated(0,19)
ERBB2	EST121T	17	37880998	G	G	T	20/27	Missense	SNP	p.G776V	139	86	53	0,38	rs144434331	probably_damaging(0,996)	deleterious(0,02)
ERBB2	EST136T	17	37881000	G	G	T	20/27	Missense	SNP	p.V777L	341	269	72	0,21	rs121913471	benign(0,006)	deleterious(0,05)
ERBB2	EST157T	17	37879658	G	G	A	17/27	Missense	SNP	p.R678Q	104	81	23	0,22		benign(0,022)	tolerated(0,19)
ERBB2	EST158T	17	37883959	G	G	C	27/27	Missense	SNP	p.D1144H	201	167	34	0,17	rs138611862	benign(0,149)	tolerated(0,06)
ERBB2	EST162T	17	37883959	G	C	C	27/27	Missense	SNP	p.D1144H	666	9	657	0,99	rs138611862	benign(0,149)	tolerated(0,06)
ERBB2	EST177T	17	37866662	G	G	A	7/27	Missense	SNP	p.D277N	147	121	26	0,18		benign(0,022)	tolerated(0,5)
ERBB2	EST189T	17	37879658	G	A	A	17/27	Missense	SNP	p.R678Q	1978	59	1919	0,97		benign(0,022)	tolerated(0,19)
ERBB2	EST204T-A	17	37883774	C	C	-	26/27	Frame_Shift_Del	DEL	p.L1131*	137	81	56	0,41	novel		
ERBB2	EST215T	17	37883986	C	C	T	27/27	Nonsense	SNP	p.R1153*	236	76	160	0,68			
ERBB2	EST48T	17	37881332	G	G	A	21/27	Missense	SNP	p.V842I	1615	1238	375	0,23		probably_damaging(0,998)	deleterious(0)
ERBB2	EST48T	17	37883240	G	G	A	25/27	Missense	SNP	p.R1048H	924	756	168	0,18	rs749539903	probably_damaging(0,932)	tolerated(0,05)
ERBB2	GCY107T	17	37881972	G	G	-	23/27	Frame_Shift_Del	DEL	p.E914Sfs*2	139	101	38	0,27	novel		
ERBB3	EST100T	12	56490848	G	G	A	20/28	Missense	SNP	p.S765N	1760	913	847	0,48	novel	probably_damaging(0,972)	deleterious(0)
ERBB3	EST108T	12	56487919	CTC	CTC	-	14/28	In_Frame_Del	DEL	p.S551del	2204	1918	286	0,13	rs766897145		

Hugo_Symbol	Tumor_Sample_Barcode	Chromosome	Start_Position	Reference_Allele	Tumor_Seq_Allele1	Tumor_Seq_Allele2	Exon_Number	Variant_Classification	Variant_Type	HGVSp_Short	t_depth	t_ref_count	t_alt_count	t_vaf	dbSNP_RS	PolyPhen	SIFT
ERBB3	EST119T	12	56478854	G	G	A	3/28	Missense	SNP	p.V104M	322	250	72	0,22		possibly_damaging(0,789)	deleterious(0,05)
ERBB3	EST153T-B	12	56490311	G	G	A	18/28	Missense	SNP	p.E694K	305	201	104	0,34	novel	probably_damaging(0,987)	deleterious(0,05)
ERBB3	EST154T	12	56481660	C	C	T	6/28	Missense	SNP	p.A232V	318	76	242	0,76		probably_damaging(1)	deleterious(0)
ERBB3	EST160T	12	56495462	GAG	GAG	-	28/28	In_Frame_Del	DEL	p.E1219del	268	229	39	0,15			
ERBB3	EST163T-B	12	56493677	A	A	G	25/28	Missense	SNP	p.K998R	194	100	94	0,48	rs56259600	benign(0,075)	tolerated(0,62)
ERBB3	EST166T	12	56482437	A	A	G	8/28	Missense	SNP	p.K329E	185	104	81	0,44		probably_damaging(0,999)	deleterious(0)
ERBB3	EST168T	12	56490980	A	A	G	20/28	Missense	SNP	p.Q809R	167	143	24	0,14	novel	probably_damaging(0,987)	deleterious(0,03)
ERBB3	EST210T	12	56494909	G	G	A	27/28	Missense	SNP	p.R1089Q	117	56	61	0,52	rs774819745	benign(0,104)	tolerated(0,23)
ERBB3	EST212T	12	56495016	C	C	T	27/28	Missense	SNP	p.R1125W	216	147	69	0,32	rs776728303	probably_damaging(0,984)	deleterious(0)
ERBB3	EST216T	12	56482420	G	G	A	8/28	Missense	SNP	p.C323Y	167	88	79	0,47	rs771534313	probably_damaging(1)	deleterious(0)
ERBB3	EST48T	12	56481612	G	G	C	6/28	Missense	SNP	p.G216A	1822	1489	333	0,18		possibly_damaging(0,646)	deleterious(0,03)
ERBB3	GCY107T	12	56495610	G	G	T	28/28	Missense	SNP	p.R1267L	54	46	8	0,15	rs538526313	benign(0,025)	tolerated(0,15)
FAT4	EST108T	4	126237801	G	G	A	1/17	Missense	SNP	p.A79T	1837	1421	414	0,23	rs767730943	benign(0,103)	
FAT4	EST108T	4	126369858	G	G	T	9/17	Missense	SNP	p.D2563Y	1301	969	332	0,26	rs755593093	possibly_damaging(0,818)	
FAT4	EST110T	4	126397351	G	G	A	12/17	Missense	SNP	p.C4078Y	222	127	95	0,43	novel	probably_damaging(0,961)	
FAT4	EST156T-A	4	126371480	C	C	G	9/17	Missense	SNP	p.S3103R	304	192	112	0,37	novel	benign(0,014)	

Hugo_Symbol	Tumor_Sample_Barcode	Chromosome	Start_Position	Reference_Allele	Tumor_Seq_Allele1	Tumor_Seq_Allele2	Exon_Number	Variant_Classification	Variant_Type	HGVSp_Short	t_depth	t_ref_count	t_alt_count	t_vaf	dbSNP_RS	PolyPhen	SIFT
FAT4	EST156T-A	4	126372489	T	T	C	9/17	Missense	SNP	p.F3440L	380	332	48	0,13		probably_damaging(0,997)	
FAT4	EST157T	4	126241702	A	A	G	1/17	Missense	SNP	p.D1379G	489	418	71	0,15		probably_damaging(1)	
FAT4	EST160T	4	126328095	G	G	A	3/17	Missense	SNP	p.D1790N	289	238	51	0,18		probably_damaging(1)	
FAT4	EST162T	4	126369835	C	C	T	9/17	Missense	SNP	p.T2555I	255	197	58	0,23	novel	probably_damaging(1)	
FAT4	EST166T	4	126242268	A	A	G	1/17	Missense	SNP	p.I1568V	281	144	137	0,49	rs760673911	benign(0,004)	
FAT4	EST184T	4	126412327	C	C	G	17/17	Missense	SNP	p.P4784A	369	162	207	0,56	novel	probably_damaging(0,996)	
FAT4	EST189T	4	126373858	C	C	T	9/17	Missense	SNP	p.A3896V	371	198	169	0,46	rs138275098	probably_damaging(0,958)	
FAT4	EST191T	4	126370455	A	A	C	9/17	Missense	SNP	p.N2762H	330	190	140	0,42	rs147281598	benign(0,014)	
FAT4	EST199T	4	126398416	A	A	G	13/17	Missense	SNP	p.I4134V	333	141	192	0,58	rs149985937	benign(0,016)	
FAT4	EST201T	4	126355484	C	C	A	7/17	Missense	SNP	p.A2368E	497	272	225	0,45	rs116568645	benign(0,051)	
FAT4	EST204T-A	4	126237763	C	C	T	1/17	Missense	SNP	p.T66M	284	179	105	0,37	novel	probably_damaging(0,998)	
FAT4	EST204T-A	4	126238021	G	G	A	1/17	Missense	SNP	p.R152H	251	168	83	0,33		probably_damaging(0,993)	
FAT4	EST212T	4	126411862	G	G	A	17/17	Missense	SNP	p.A4629T	352	219	133	0,38	rs748276944	probably_damaging(0,993)	
FAT4	EST214T	4	126337730	G	G	A	6/17	Missense	SNP	p.R2324Q	444	375	69	0,16	rs200719060	probably_damaging(0,999)	
FAT4	EST217T	4	126371606	A	A	G	9/17	Missense	SNP	p.I3145M	300	187	113	0,38	rs375872898	benign(0,436)	
FAT4	EST46T-B	4	126412593	A	A	C	17/17	Missense	SNP	p.Q4872H	1770	1511	259	0,15	rs761187408	probably_damaging(0,993)	
FAT4	EST97T	4	126372174	T	T	C	9/17	Missense	SNP	p.Y3335H	1894	1736	158	0,08		probably_damaging(1)	

Hugo_Symbol	Tumor_Sample_Barcode	Chromosome	Start_Position	Reference_Allele	Tumor_Seq_Allele1	Tumor_Seq_Allele2	Exon_Number	Variant_Classification	Variant_Type	HGVSp_Short	t_depth	t_ref_count	t_alt_count	t_vaf	dbSNP_RS	PolyPhen	SIFT
FAT4	GCY107T	4	126241587	G	G	T	1/17	Missense	SNP	p.D1341Y	59	50	9	0,15	novel	probably_damaging(1)	
FAT4	GCY107T	4	126337723	C	C	G	6/17	Missense	SNP	p.L2322V	58	49	9	0,16	rs767728689	benign(0,361)	
FAT4	GCY107T	4	126355435	GTCA TA	GTC ATA	-	7/17	In_Frame_Del	DEL	p.I2353_V2354del	38	21	17	0,45	novel		
FAT4	GCY107T	4	126367454	G	G	T	8/17	Missense	SNP	p.R2400S	115	73	42	0,37	novel	benign(0,006)	
FAT4	GCY107T	4	126373168	G	G	T	9/17	Missense	SNP	p.C3666F	42	34	8	0,19	novel	probably_damaging(0,997)	
FBXO11	EST157T	2	48035325	T	T	C	23/23	Missense	SNP	p.T906A	360	299	61	0,17	novel	possibly_damaging(0,739)	deleterious_low_confidence(0,01)
FBXW7	EST157T	4	153247366	C	C	T	10/12	Missense	SNP	p.R479Q	341	285	56	0,16		probably_damaging(1)	deleterious(0,03)
FBXW7	EST165T-B	4	153247168	T	T	C	10/12	Missense	SNP	p.Y545C	261	217	44	0,17		probably_damaging(1)	deleterious(0)
FBXW7	EST167T	4	153251907	G	G	A	7/12	Nonsense	SNP	p.R367*	280	206	74	0,26			
FBXW7	EST168T	4	153249384	C	C	T	9/12	Missense	SNP	p.R465H	271	236	35	0,13		probably_damaging(0,998)	deleterious(0)
FBXW7	EST46T-B	4	153249448	T	T	C	9/12	Missense	SNP	p.K444E	1384	1193	191	0,14	novel	probably_damaging(0,977)	deleterious(0)
FGFR1	EST167T	8	38277200	T	T	C	10/19	Missense	SNP	p.I410V	235	137	98	0,42	novel	possibly_damaging(0,907)	tolerated(0,18)
FGFR1	EST198T	8	38314882	G	G	A	3/19	Missense	SNP	p.P61L	61	39	22	0,36	rs145434725	possibly_damaging(0,804)	tolerated_low_confidence(0,27)
FLG	EST115T	1	152275204	T	T	C	3/3	Missense	SNP	p.Q4053R	421	253	168	0,40	novel	unknown(0)	
FLG	EST118T	1	152286592	T	T	A	3/3	Missense	SNP	p.Y257F	355	223	132	0,37	rs145497350	benign(0,027)	
FLG	EST118T	1	152286593	A	A	C	3/3	Missense	SNP	p.Y257D	357	224	133	0,37	rs142607263	possibly_damaging(0,537)	
FLG	EST157T	1	152287130	C	C	T	3/3	Missense	SNP	p.V78I	288	232	56	0,19	rs753608358	benign(0,202)	

Hugo_Symbol	Tumor_Sample_Barcode	Chromosome	Start_Position	Reference_Allele	Tumor_Seq_Allele1	Tumor_Seq_Allele2	Exon_Number	Variant_Classification	Variant_Type	HGVSp_Short	t_depth	t_ref_count	t_alt_count	t_vaf	dbSNP_RS	PolyPhen	SIFT
FLG	EST167T	1	152287861	-	-	T	2/3	Frame_Shift_Ins	INS	p.N24Kfs*3	394	289	105	0,27	novel		
FRMD4A	EST108T	10	13696452	G	G	-	23/25	Frame_Shift_Del	DEL	p.P1005Qfs*8	465	339	126	0,27			
FRMD4A	EST112T	10	13699253	G	G	T	22/25	Missense	SNP	p.A779E	28	21	7	0,25	rs139853925	probably_damaging(0,997)	tolerated(0,19)
FRMD4A	EST119T	10	13696452	G	G	-	23/25	Frame_Shift_Del	DEL	p.P1005Qfs*8	27	19	8	0,30			
FRMD4A	EST119T	10	13699255	C	C	A	22/25	Missense	SNP	p.K778N	111	76	35	0,32	novel	possibly_damaging(0,844)	tolerated(0,22)
FRMD4A	EST150T	10	13696452	G	G	-	23/25	Frame_Shift_Del	DEL	p.P1005Qfs*8	29	23	6	0,21			
FRMD4A	EST157T	10	13708227	T	T	-	18/25	Frame_Shift_Del	DEL	p.K491Nfs*2	240	192	48	0,20	rs140083268		
FRMD4A	EST160T	10	13696452	G	G	-	23/25	Frame_Shift_Del	DEL	p.P1005Qfs*8	62	52	10	0,16			
FRMD4A	EST160T	10	13702500	G	G	A	20/25	Missense	SNP	p.L572F	203	91	112	0,55	rs145701309	possibly_damaging(0,771)	deleterious_low_confidence(0,02)
FRMD4A	EST89T	10	13698887	G	G	A	22/25	Missense	SNP	p.S901L	493	259	234	0,47	rs200846869	probably_damaging(0,986)	tolerated(0,11)
FRMD4A	GCY107T	10	13789755	G	G	T	9/25	Missense	SNP	p.H177N	117	93	24	0,21	novel	probably_damaging(0,991)	deleterious(0)
GLI3	EST108T	7	42088206	G	G	T	5/15	Missense	SNP	p.S188Y	2235	1404	831	0,37	rs369926331	possibly_damaging(0,855)	deleterious(0)
GLI3	EST110T	7	42085094	G	G	T	6/15	Missense	SNP	p.H239N	217	168	49	0,23	rs761281345	probably_damaging(0,993)	tolerated(0,08)
GLI3	EST122T-A	7	42004451	C	C	A	15/15	Missense	SNP	p.G1407V	145	110	35	0,24	novel	possibly_damaging(0,493)	deleterious_low_confidence(0)
GLI3	EST156T-A	7	42262806	A	A	G	2/15	Missense	SNP	p.V16A	263	200	63	0,24	novel	benign(0,002)	tolerated_low_confidence(0,28)

Hugo_Symbol	Tumor_Sample_Barcode	Chromosome	Start_Position	Reference_Allele	Tumor_Seq_Allele1	Tumor_Seq_Allele2	Exon_Number	Variant_Classification	Variant_Type	HGVSp_Short	t_depth	t_ref_count	t_alt_count	t_vaf	dbSNP_RS	PolyPhen	SIFT
GLI3	EST164T	7	42006077	G	G	T	15/15	Nonsense	SNP	p.S865*	116	98	18	0,16	novel		
GLI3	EST167T	7	42065818	C	C	A	8/15	Missense	SNP	p.G408C	292	229	63	0,22	rs200411081	probably_damaging(1)	tolerated(0,12)
GLI3	EST170T	7	42012033	G	G	A	13/15	Missense	SNP	p.T669I	231	117	114	0,49	rs139108417	benign(0,091)	tolerated(0,11)
GLI3	EST180T	7	42012166	G	G	A	13/15	Missense	SNP	p.R625W	237	145	92	0,39	rs121917712	probably_damaging(1)	deleterious(0,01)
GLI3	EST201T	7	42079764	C	C	T	7/15	Missense	SNP	p.D301N	334	150	184	0,55	rs752246768	probably_damaging(0,999)	deleterious(0,02)
GLI3	EST204T-A	7	42005573	G	G	-	15/15	Frame_Shift_Del	DEL	p.P1033Rfs*46	107	70	37	0,35	rs376956433		
GLI3	EST212T	7	42005875	C	C	A	15/15	Missense	SNP	p.K932N	80	53	27	0,34	novel	probably_damaging(0,96)	deleterious(0)
GPR124	EST118T	8	37690653	G	G	A	9/19	Missense	SNP	p.R408H	221	187	34	0,15	rs200541731	benign(0,082)	tolerated(0,13)
GPR124	EST121T	8	37689092	C	C	T	8/19	Missense	SNP	p.R362C	82	51	31	0,38	rs375804717	probably_damaging(0,957)	deleterious(0)
GPR124	EST157T	8	37654958	G	G	A	1/19	Missense	SNP	p.V58I	89	72	17	0,19	novel	benign(0,008)	tolerated(0,16)
GPR124	EST167T	8	37691605	G	G	-	11/19	Frame_Shift_Del	DEL	p.A525Pfs*12	97	73	24	0,25			
GPR124	EST172T	8	37695422	C	C	T	14/19	Missense	SNP	p.H742Y	21	17	4	0,19	novel	benign(0,014)	tolerated(0,16)
GPR124	EST180T	8	37688336	A	A	C	7/19	Missense	SNP	p.D276A	213	172	41	0,19	novel	benign(0,045)	tolerated(0,14)
GPR124	EST212T	8	37699108	C	C	-	19/19	Frame_Shift_Del	DEL	p.P1086Lfs*217	80	60	20	0,25	novel		
GPR124	EST46T-B	8	37690604	G	G	-	9/19	Frame_Shift_Del	DEL	p.G393Vfs*40	1692	1416	274	0,16	rs549024344		
GPR124	EST46T-B	8	37696513	G	G	A	15/19	Missense	SNP	p.A767T	1267	1096	171	0,13	novel	benign(0,15)	tolerated(0,26)

Hugo_Symbol	Tumor_Sample_Barcode	Chromosome	Start_Position	Reference_Allele	Tumor_Seq_Allele1	Tumor_Seq_Allele2	Exon_Number	Variant_Classification	Variant_Type	HGVSp_Short	t_depth	t_ref_count	t_alt_count	t_vaf	dbSNP_RS	PolyPhen	SIFT
GPR124	EST46T-B	8	37698849	C	C	T	19/19	Missense	SNP	p.A998V	1628	1464	164	0,10	novel	benign(0,036)	tolerated(0,71)
HDAC4	EST119T	2	240002823	G	G	-	22/27	Frame_Shift_Del	DEL	p.M902Wfs*55	101	56	45	0,45	rs748412007		
HDAC4	EST157T	2	240002823	G	G	-	22/27	Frame_Shift_Del	DEL	p.M902Wfs*55	104	91	13	0,13	rs748412007		
HDAC4	EST46T-B	2	239988440	AC	AC	-	24/27	Frame_Shift_Del	DEL	p.V989Ffs*9	1913	1715	198	0,10	novel		
HIST1H1E	EST180T	6	26157265	C	C	T	1/1	Missense	SNP	p.A216V	210	101	109	0,52	novel	unknown(0)	tolerated(0,06)
HIST1H1E	EST202T	6	26156758	C	C	T	1/1	Missense	SNP	p.A47V	144	75	69	0,48	rs141942142	possibly_damaging(0,45)	deleterious(0,04)
HIST1H1E	EST48T	6	26156758	C	C	T	1/1	Missense	SNP	p.A47V	1007	321	686	0,68	rs141942142	possibly_damaging(0,45)	deleterious(0,04)
IGF2BP3	EST201T	7	23381693	G	G	A	10/15	Missense	SNP	p.P398L	196	90	106	0,54	rs138438351	benign(0,001)	tolerated(0,22)
IGF2BP3	GCY107T	7	23458401	C	C	A	3/15	Missense	SNP	p.Q93H	206	173	33	0,16	novel	benign(0,139)	tolerated(0,07)
IL2RG	EST120T	X	70330449	T	T	-	3/8	Frame_Shift_Del	DEL	p.K120Rfs*27	246	150	96	0,39			
IL2RG	EST204T-A	X	70329126	A	A	G	5/8	Missense	SNP	p.W237R	163	132	31	0,19		probably_damaging(1)	deleterious(0)
IL2RG	EST46T-B	X	70330449	T	T	-	3/8	Frame_Shift_Del	DEL	p.K120Rfs*27	2647	2256	382	0,14			
IL2RG	GCY107T	X	70328139	G	G	C	7/8	Missense	SNP	p.H304Q	178	118	60	0,34	rs145282692	benign(0,016)	tolerated(0,34)
IL7R	EST157T	5	35867541	A	A	-	3/8	Frame_Shift_Del	DEL	p.I121*	182	158	24	0,13	novel		
IL7R	EST173T	5	35876373	G	G	C	8/8	Missense	SNP	p.D389H	373	179	194	0,52	rs143596606	possibly_damaging(0,718)	tolerated(0,09)
IL7R	EST181T	5	35867525	A	A	C	3/8	Missense	SNP	p.E113D	497	301	196	0,39	rs11567735	benign(0)	tolerated(0,54)
IL7R	EST186T	5	35875645	G	G	A	7/8	Missense	SNP	p.D278N	403	183	220	0,55	rs201449880	probably_damaging(0,98)	deleterious(0,01)

Hugo_Symbol	Tumor_Sample_Barcode	Chromosome	Start_Position	Reference_Allele	Tumor_Seq_Allele1	Tumor_Seq_Allele2	Exon_Number	Variant_Classification	Variant_Type	HGVSp_Short	t_depth	t_ref_count	t_alt_count	t_vaf	dbSNP_RS	PolyPhen	SIFT
IL7R	EST201T	5	35876358	T	T	C	8/8	Missense	SNP	p.S384P	360	197	163	0,45	rs200775167	benign(0,178)	deleterious(0,05)
IL7R	EST204T-A	5	35876454	C	C	-	8/8	Frame_Shift_Del	DEL	p.P417Lfs*10	293	197	93	0,32	novel		
IL7R	EST46T-B	5	35874604	G	G	T	6/8	Missense	SNP	p.A254S	2404	1148	1250	0,52	rs137868226	benign(0,017)	tolerated(0,21)
IMPG2	EST110T	3	100961663	C	C	T	14/19	Missense	SNP	p.R964Q	415	234	181	0,44		probably_damaging(0,999)	deleterious(0)
IMPG2	EST123T	3	100988375	G	G	A	8/19	Missense	SNP	p.R291C	648	537	111	0,17	rs372789677	possibly_damaging(0,873)	deleterious(0,05)
IMPG2	EST139T1	3	100951751	C	C	A	15/19	Missense	SNP	p.C1036F	413	367	46	0,11	novel	probably_damaging(1)	deleterious(0)
IMPG2	EST198T	3	100961657	T	T	G	14/19	Missense	SNP	p.K966T	223	168	55	0,25	rs201685456	possibly_damaging(0,859)	deleterious(0)
IMPG2	EST213T	3	100962661	A	A	C	13/19	Missense	SNP	p.I838M	485	424	61	0,13	novel	probably_damaging(0,984)	deleterious(0)
IRF2	EST157T	4	185329341	T	T	-	6/9	Frame_Shift_Del	DEL	p.N167Mfs*7	265	225	40	0,15	rs748655801		
IRF2	EST212T	4	185320085	G	G	-	7/9	Frame_Shift_Del	DEL	p.V227Cfs*91	67	26	41	0,61	rs146966318		
IWS1	EST123T	2	128244162	C	C	A	13/14	Missense	SNP	p.R765S	391	334	57	0,15	rs550435752	probably_damaging(0,957)	deleterious(0)
IWS1	EST46T-B	2	128252502	T	T	-	8/14	Frame_Shift_Del	DEL	p.K582Sfs*4	538	415	123	0,23	novel		
KIF13A	EST105T	6	17873630	T	T	G	4/39	Missense	SNP	p.E66D	2392	1410	982	0,41	rs190798348	probably_damaging(0,981)	tolerated(0,09)
KIF13A	EST115T	6	17850633	T	T	C	8/39	Missense	SNP	p.N213S	272	151	121	0,44	rs774636318	probably_damaging(0,993)	deleterious(0,04)
KIF13A	EST140T1-1	6	17852221	C	C	G	7/39	Missense	SNP	p.D183H	307	159	148	0,48	rs200098741	probably_damaging(0,992)	deleterious(0)
KIF13A	EST157T	6	17765141	T	T	C	39/39	Missense	SNP	p.N1540D	268	224	44	0,16	novel	benign(0,044)	tolerated_low_confidence(0,28)

Hugo_Symbol	Tumor_Sample_Barcode	Chromosome	Start_Position	Reference_Allele	Tumor_Seq_Allele1	Tumor_Seq_Allele2	Exon_Number	Variant_Classification	Variant_Type	HGVSp_Short	t_depth	t_ref_count	t_alt_count	t_vaf	dbSNP_RS	PolyPhen	SIFT
KIF13A	EST162T	6	17800289	C	C	T	21/39	Missense	SNP	p.R837H	249	217	32	0,13	rs778640625	probably_damaging(0,953)	deleterious(0,05)
KIF13A	EST201T	6	17828499	C	C	T	14/39	Missense	SNP	p.V502I	192	67	125	0,65	novel	benign(0,034)	tolerated(0,13)
KIF13A	EST212T	6	17788022	-	-	T	27/39	Frame_Shift_Ins	INS	p.V1116Sfs*4	274	163	110	0,40			
KIF13A	GCY107T	6	17849710	T	T	C	9/39	Missense	SNP	p.E243G	188	168	18	0,10	novel	possibly_damaging(0,668)	deleterious(0)
KIF2B	EST204T-A	17	51900978	G	G	A	1/1	Missense	SNP	p.R195H	303	215	88	0,29		probably_damaging(0,999)	deleterious(0)
KIF2B	EST215T	17	51902048	C	C	G	1/1	Missense	SNP	p.R552G	220	88	132	0,60	rs114241810	benign(0,003)	tolerated(0,26)
KMT2C	EST119T	7	151874063	T	T	G	38/59	Missense	SNP	p.E2825D	552	451	101	0,18	novel	possibly_damaging(0,814)	
KMT2C	EST119T	7	151874149	T	T	-	38/59	Frame_Shift_Del	DEL	p.K2797Rfs*26	497	296	158	0,32			
KMT2C	EST119T	7	152012386	T	T	-	4/59	Frame_Shift_Del	DEL	p.S143Vfs*3	446	375	71	0,16	novel		
KMT2C	EST120T	7	151874148	TT	TT	-	38/59	Frame_Shift_Del	DEL	p.K2797Gfs*11	548	253	153	0,28			
KMT2C	EST121T	7	151860294	G	G	-	43/59	Frame_Shift_Del	DEL	p.D3457Tfs*10	392	317	75	0,19	rs146018427		
KMT2C	EST121T	7	151877172	G	G	A	37/59	Nonsense	SNP	p.Q2397*	368	278	90	0,24	novel		
KMT2C	EST136T	7	151875091	C	C	A	38/59	Nonsense	SNP	p.G2483*	82	71	11	0,13	novel		
KMT2C	EST137T	7	151873293	G	G	A	38/59	Missense	SNP	p.P3082L	157	64	93	0,59	rs61730545	probably_damaging(0,999)	
KMT2C	EST157T	7	151845729	A	A	G	52/59	Missense	SNP	p.V4428A	378	318	50	0,13	novel	probably_damaging(0,992)	

Hugo_Symbol	Tumor_Sample_Barcode	Chromosome	Start_Position	Reference_Allele	Tumor_Seq_Allele1	Tumor_Seq_Allele2	Exon_Number	Variant_Classification	Variant_Type	HGVSp_Short	t_depth	t_ref_count	t_alt_count	t_vaf	dbSNP_RS	PolyPhen	SIFT
KMT2C	EST157T	7	151874149	T	T	-	38/59	Frame_Shift_Del	DEL	p.K2797Rfs*26	404	244	157	0,39			
KMT2C	EST157T	7	151880202	T	T	C	35/59	Missense	SNP	p.K1708E	302	228	74	0,25	novel	probably_damaging(0,998)	
KMT2C	EST161T	7	151860220	T	T	A	43/59	Missense	SNP	p.Q3481L	355	247	108	0,30	novel	benign(0,003)	
KMT2C	EST167T	7	151860149	T	T	C	43/59	Missense	SNP	p.N3505D	489	259	230	0,47	rs140626076	benign(0,097)	
KMT2C	EST167T	7	151874148	TT	TT	-	38/59	Frame_Shift_Del	DEL	p.K2797Gfs*11	449	338	96	0,21			
KMT2C	EST167T	7	151874526	G	G	A	38/59	Missense	SNP	p.T2671M	537	410	124	0,23	rs761335251	possibly_damaging(0,485)	
KMT2C	EST177T	7	151873278	A	A	G	38/59	Missense	SNP	p.I3087T	179	100	79	0,44	rs201164931	probably_damaging(0,995)	
KMT2C	EST180T	7	151874149	T	T	-	38/59	Frame_Shift_Del	DEL	p.K2797Rfs*26	407	238	159	0,39			
KMT2C	EST195T	7	151845609	G	G	A	52/59	Missense	SNP	p.T4468M	461	382	79	0,17	rs369745886	benign(0,019)	
KMT2C	EST204T-A	7	151874149	T	T	-	38/59	Frame_Shift_Del	DEL	p.K2797Rfs*26	351	86	258	0,74			
KMT2C	EST212T	7	151856070	G	G	A	44/59	Nonsense	SNP	p.R3850*	594	364	224	0,38	novel		
KMT2C	EST212T	7	151874149	T	T	-	38/59	Frame_Shift_Del	DEL	p.K2797Rfs*26	478	309	153	0,32			
KMT2C	EST216T	7	151859897	G	C	C	43/59	Missense	SNP	p.L3589V	228	0	228	1,00	rs201649535	probably_damaging(0,997)	
KMT2C	EST217T	7	151851132	A	A	G	48/59	Missense	SNP	p.I4080T	311	168	143	0,46	rs150192787	possibly_damaging(0,67)	
KMT2C	EST46T-B	7	151874149	T	T	-	38/59	Frame_Shift_Del	DEL	p.K2797Rfs*26	1420	1157	232	0,16			

Hugo_Symbol	Tumor_Sample_Barcode	Chromosome	Start_Position	Reference_Allele	Tumor_Seq_Allele1	Tumor_Seq_Allele2	Exon_Number	Variant_Classification	Variant_Type	HGVSp_Short	t_depth	t_ref_count	t_alt_count	t_vaf	dbSNP_RS	PolyPhen	SIFT
KMT2C	EST48T	7	151874149	T	T	-	38/59	Frame_Shift_Del	DEL	p.K2797Rfs*26	1419	964	425	0,30			
KRAS	EST108T	12	25398284	C	C	T	2/6	Missense	SNP	p.G12D	1813	1071	742	0,41	rs121913529	benign(0,361)	deleterious(0)
KRAS	EST120T	12	25398281	C	C	T	2/6	Missense	SNP	p.G13D	234	191	43	0,18	rs112445441	possibly_damaging(0,506)	deleterious(0,04)
KRAS	EST157T	12	25398281	C	C	T	2/6	Missense	SNP	p.G13D	294	256	38	0,13	rs112445441	possibly_damaging(0,506)	deleterious(0,04)
KRAS	EST160T	12	25398284	C	C	T	2/6	Missense	SNP	p.G12D	301	230	71	0,24	rs121913529	benign(0,361)	deleterious(0)
KRAS	EST188T	12	25398284	C	C	A	2/6	Missense	SNP	p.G12V	315	238	77	0,24	rs121913529	possibly_damaging(0,479)	deleterious(0)
KRAS	EST201T	12	25398285	C	C	T	2/6	Missense	SNP	p.G12S	392	340	52	0,13	rs121913530	possibly_damaging(0,644)	deleterious(0,03)
LAMA1	EST101T	18	7017291	A	A	G	20/63	Missense	SNP	p.C932R	805	127	678	0,84	rs767217815	probably_damaging(0,998)	deleterious(0)
LAMA1	EST119T	18	7009359	A	A	-	27/63	Frame_Shift_Del	DEL	p.W1294Gfs*66	354	250	104	0,29	novel		
LAMA1	EST123T	18	7013996	C	C	T	23/63	Missense	SNP	p.G1061S	338	185	153	0,45	rs768468360	probably_damaging(0,996)	deleterious(0,01)
LAMA1	EST139T1	18	7032153	C	C	T	16/63	Missense	SNP	p.R729H	237	87	150	0,63	rs144429570	probably_damaging(0,998)	deleterious(0,01)
LAMA1	EST149T	18	6964778	T	T	C	51/63	Missense	SNP	p.Y2407C	187	74	113	0,60	rs199811630	probably_damaging(0,923)	tolerated(0,12)
LAMA1	EST157T	18	6978296	G	G	A	43/63	Missense	SNP	p.A2030V	173	153	20	0,12	rs761631965	benign(0,002)	tolerated(0,34)
LAMA1	EST158T	18	6961601	C	C	T	53/63	Missense	SNP	p.R2537H	117	93	24	0,21	rs372523357	possibly_damaging(0,871)	deleterious(0,02)
LAMA1	EST158T	18	7010327	C	C	T	26/63	Missense	SNP	p.V1249I	209	149	60	0,29	rs148225763	benign(0,004)	tolerated(0,24)
LAMA1	EST161T	18	6999495	G	G	A	32/63	Missense	SNP	p.R1538W	167	93	74	0,44	rs149937004	possibly_damaging(0,901)	deleterious(0,02)

Hugo_Symbol	Tumor_Sample_Barcode	Chromosome	Start_Position	Reference_Allele	Tumor_Seq_Allele1	Tumor_Seq_Allele2	Exon_Number	Variant_Classification	Variant_Type	HGVSp_Short	t_depth	t_ref_count	t_alt_count	t_vaf	dbSNP_RS	PolyPhen	SIFT
LAMA1	EST164T	18	6983136	C	C	T	40/63	Missense	SNP	p.A1920T	366	203	163	0,45	rs757465411	possibly_damaging(0,78)	deleterious(0)
LAMA1	EST165T-B	18	7011463	C	C	T	25/63	Missense	SNP	p.D1175N	231	102	129	0,56	rs146232089	benign(0,11)	deleterious(0,01)
LAMA1	EST165T-B	18	7050842	T	T	G	4/63	Missense	SNP	p.S147R	261	163	98	0,38	rs745685933	benign(0,008)	tolerated(0,25)
LAMA1	EST166T	18	7008589	C	C	A	28/63	Missense	SNP	p.M1340I	210	176	34	0,16	novel	benign(0,192)	deleterious(0,02)
LAMA1	EST166T	18	7032103	C	C	T	16/63	Missense	SNP	p.G746S	234	168	66	0,28	rs372203316	benign(0,377)	deleterious(0,01)
LAMA1	EST174T	18	6949210	G	G	A	59/63	Nonsense	SNP	p.R2816*	202	78	124	0,61	novel		
LAMA1	EST175T	18	6961610	C	C	T	53/63	Missense	SNP	p.R2534Q	253	110	143	0,57	rs200639472	benign(0,034)	tolerated(0,28)
LAMA1	EST177T	18	7013887	G	G	A	23/63	Missense	SNP	p.T1097M	305	238	67	0,22	rs377575918	probably_damaging(0,989)	deleterious(0)
LAMA1	EST177T	18	7016547	T	T	C	21/63	Missense	SNP	p.K978E	207	176	31	0,15	rs764398676	benign(0,004)	tolerated(0,53)
LAMA1	EST182T	18	7038903	T	T	C	11/63	Missense	SNP	p.Y490C	434	350	84	0,19	novel	probably_damaging(0,987)	deleterious(0)
LAMA1	EST189T	18	7036072	C	C	T	13/63	Missense	SNP	p.G585R	178	149	29	0,16	rs552082654	probably_damaging(0,911)	deleterious(0,03)
LAMA1	EST204T-A	18	7034686	T	T	A	14/63	Missense	SNP	p.N615Y	275	172	103	0,37	novel	probably_damaging(0,996)	deleterious(0)
LAMA1	EST206T	18	6943262	C	C	T	62/63	Missense	SNP	p.G2995E	289	172	117	0,40		possibly_damaging(0,842)	deleterious(0,04)
LAMA1	EST206T	18	7012083	G	G	A	24/63	Missense	SNP	p.R1140C	159	84	75	0,47	rs149357158	possibly_damaging(0,849)	tolerated(0,06)
LAMA1	EST216T	18	7044760	A	A	T	7/63	Missense	SNP	p.W313R	232	183	49	0,21		probably_damaging(0,999)	deleterious(0)

Hugo_Symbol	Tumor_Sample_Barcode	Chromosome	Start_Position	Reference_Allele	Tumor_Seq_Allele1	Tumor_Seq_Allele2	Exon_Number	Variant_Classification	Variant_Type	HGVSp_Short	t_depth	t_ref_count	t_alt_count	t_vaf	dbSNP_RS	PolyPhen	SIFT
LAMA1	EST48T	18	6950914	A	A	G	58/63	Missense	SNP	p.M2755T	1058	788	270	0,26	rs780559329	benign(0,012)	tolerated(0,05)
LAMA1	EST48T	18	6983135	G	G	A	40/63	Missense	SNP	p.A1920V	1542	1219	323	0,21	rs751718364	benign(0,102)	deleterious(0,03)
LAMA1	EST91T	18	7040178	C	C	T	10/63	Missense	SNP	p.R440H	2025	1698	325	0,16	rs756452553	benign(0,077)	deleterious(0,02)
LAMA1	GCY107T	18	6961638	C	C	A	53/63	Missense	SNP	p.A2525S	76	64	12	0,16	novel	possibly_damaging(0,633)	tolerated(0,51)
LAMA1	GCY107T	18	7050834	C	C	T	4/63	Nonsense	SNP	p.W149*	92	78	14	0,15	novel		
LAMA1	GCY17T	18	7008536	A	A	T	28/63	Missense	SNP	p.L1358H	1152	1041	111	0,10	novel	benign(0,078)	tolerated(0,09)
LARP4B	EST108T	10	890939	TT	TT	-	5/17	Frame_Shift_Del	DEL	p.K162Nfs*8	2699	2011	685	0,25			
LARP4B	EST160T	10	875516	C	C	A	10/17	Missense	SNP	p.A312S	333	285	48	0,14	novel	probably_damaging(0,916)	deleterious_low_confidence(0,01)
LARP4B	EST167T	10	890940	T	T	-	5/17	Frame_Shift_Del	DEL	p.T163Hfs*47	406	282	121	0,30			
LARP4B	EST180T	10	890940	T	T	-	5/17	Frame_Shift_Del	DEL	p.T163Hfs*47	260	173	87	0,33			
LARP4B	EST204T-A	10	890940	T	T	-	5/17	Frame_Shift_Del	DEL	p.T163Hfs*47	301	207	94	0,31			
LARP4B	EST212T	10	890940	T	T	-	5/17	Frame_Shift_Del	DEL	p.T163Hfs*47	382	293	89	0,23			
MACF1	EST100T	1	39749132	C	C	T	9/94	Missense	SNP	p.S292L	1572	944	628	0,40		probably_damaging(0,98)	
MACF1	EST108T	1	39929336	A	A	G	90/94	Missense	SNP	p.Q5185R	2603	1981	622	0,24	novel	probably_damaging(0,953)	
MACF1	EST119T	1	39549927	T	T	C	2/94	Missense	SNP	p.S13P	155	120	35	0,23	novel	unknown(0)	
MACF1	EST119T	1	39853998	G	G	A	53/94	Missense	SNP	p.V3100I	384	292	92	0,24	novel	benign(0,007)	

Hugo_Symbol	Tumor_Sample_Barcode	Chromosome	Start_Position	Reference_Allele	Tumor_Seq_Allele1	Tumor_Seq_Allele2	Exon_Number	Variant_Classification	Variant_Type	HGVSp_Short	t_depth	t_ref_count	t_alt_count	t_vaf	dbSNP_RS	PolyPhen	SIFT
MACF1	EST135T1	1	39929291	G	G	C	90/94	Missense	SNP	p.R5170T	173	103	70	0,40	novel	probably_damaging(0,944)	
MACF1	EST157T	1	39775941	T	T	C	25/94	Missense	SNP	p.C986R	229	193	36	0,16	novel	benign(0,084)	
MACF1	EST157T	1	39903534	T	T	C	67/94	Missense	SNP	p.V3966A	227	171	56	0,25	novel	probably_damaging(0,999)	
MACF1	EST157T	1	39908444	G	G	T	74/94	Missense	SNP	p.G4329V	244	197	47	0,19	novel	probably_damaging(0,995)	
MACF1	EST157T	1	39918395	T	T	C	83/94	Missense	SNP	p.W4826R	188	146	41	0,22	novel	probably_damaging(0,996)	
MACF1	EST157T	1	39918447	A	A	G	83/94	Missense	SNP	p.D4843G	216	153	63	0,29	novel	probably_damaging(0,986)	
MACF1	EST160T	1	39816496	G	G	A	38/94	Missense	SNP	p.A1607T	180	157	23	0,13	novel	benign(0,022)	
MACF1	EST160T	1	39951335	G	G	A	94/94	Missense	SNP	p.D5388N	297	248	49	0,16	novel	probably_damaging(0,957)	
MACF1	EST163T-B	1	39951243	G	G	A	94/94	Missense	SNP	p.R5357Q	123	63	60	0,49	rs77696779	possibly_damaging(0,847)	
MACF1	EST164T	1	39898283	G	G	A	62/94	Missense	SNP	p.R3743H	304	193	107	0,35	rs144615050	benign(0,011)	
MACF1	EST167T	1	39823353	G	G	A	40/94	Missense	SNP	p.E1849K	465	325	140	0,30	rs773618583	benign(0,043)	
MACF1	EST176T	1	39788295	C	C	A	32/94	Missense	SNP	p.L1354M	228	100	128	0,56	rs141025026	probably_damaging(0,999)	
MACF1	EST194T	1	39908224	G	G	T	73/94	Missense	SNP	p.E4304D	474	227	247	0,52	novel	probably_damaging(0,999)	
MACF1	EST204T-A	1	39926370	AA	AA	-	88/94	Frame_Shift_Del	DEL	p.K5085Vfs*11	394	260	134	0,34	novel		
MACF1	EST217T	1	39929291	G	G	C	90/94	Missense	SNP	p.R5170T	223	120	103	0,46	novel	probably_damaging(0,944)	

Hugo_Symbol	Tumor_Sample_Barcode	Chromosome	Start_Position	Reference_Allele	Tumor_Seq_Allele1	Tumor_Seq_Allele2	Exon_Number	Variant_Classification	Variant_Type	HGVSp_Short	t_depth	t_ref_count	t_alt_count	t_vaf	dbSNP_RS	PolyPhen	SIFT
MACF1	EST43T-A	1	39751054	C	C	G	13/94	Missense	SNP	p.L454V	1040	742	298	0,29	rs745515847	possibly_damaging(0,553)	
MACF1	EST46T-B	1	39549943	G	G	A	2/94	Missense	SNP	p.R18Q	2052	1823	225	0,11	rs372116509	benign(0,008)	
MACF1	GCY107T	1	39720001	G	G	T	5/94	Missense	SNP	p.R135M	74	57	17	0,23	novel	probably_damaging(0,951)	
MACF1	GCY107T	1	39781281	G	G	T	27/94	Missense	SNP	p.V1128F	89	63	26	0,29	novel	benign(0,145)	
MACF1	GCY107T	1	39920705	A	A	T	85/94	Missense	SNP	p.Q4945L	62	49	13	0,21	novel	probably_damaging(0,999)	
MACF1	GCY117T2	1	39788376	A	A	G	32/94	Missense	SNP	p.I1381V	273	142	131	0,48	rs367571121	benign(0,005)	
MAP2	EST157T	2	210560931	G	G	A	7/15	Missense	SNP	p.G1346D	242	212	30	0,12	novel	probably_damaging(1)	tolerated(0,08)
MAP2	EST157T	2	210565045	G	G	A	10/15	Missense	SNP	p.A1523T	228	187	36	0,16	novel	benign(0,027)	tolerated(0,06)
MAP2	EST158T	2	210518139	C	C	G	4/15	Missense	SNP	p.A82G	242	130	112	0,46	rs2271251	benign(0,007)	tolerated_low_confidence(0,67)
MAP2	EST158T	2	210559239	C	C	T	7/15	Missense	SNP	p.A782V	440	161	279	0,63	rs184529696	benign(0,006)	tolerated(1)
MAP2	EST194T	2	210557565	C	C	T	7/15	Missense	SNP	p.A224V	695	393	302	0,43	rs144699107	benign(0,002)	tolerated_low_confidence(0,12)
MAP2	GCY107T	2	210558110	A	A	G	7/15	Missense	SNP	p.K406E	69	51	18	0,26	novel	benign(0,008)	tolerated_low_confidence(0,05)
MAP2	GCY107T	2	210560726	A	A	-	7/15	Frame_Shift_Del	DEL	p.G1279Efs*2	124	105	19	0,15			
MEDAG	EST103T	13	31480852	G	G	-	1/5	Frame_Shift_Del	DEL	p.G69Afs*29	285	171	114	0,40	rs758738581		
MEDAG	EST120T	13	31480852	G	G	-	1/5	Frame_Shift_Del	DEL	p.G69Afs*29	73	60	13	0,18	rs758738581		
MEDAG	EST157T	13	31480852	G	G	-	1/5	Frame_Shift_Del	DEL	p.G69Afs*29	37	23	14	0,38	rs758738581		
MEDAG	EST175T	13	31480852	G	G	-	1/5	Frame_Shift_Del	DEL	p.G69Afs*29	103	81	22	0,21	rs758738581		

Hugo_Symbol	Tumor_Sample_Barcode	Chromosome	Start_Position	Reference_Allele	Tumor_Seq_Allele1	Tumor_Seq_Allele2	Exon_Number	Variant_Classification	Variant_Type	HGVSp_Short	t_depth	t_ref_count	t_alt_count	t_vaf	dbSNP_RS	PolyPhen	SIFT
MEDAG	EST214T	13	31495946	C	C	A	4/5	Missense	SNP	p.S250R	523	383	140	0,27	rs555397627	possibly_damaging(0,469)	deleterious(0,02)
MEDAG	EST216T	13	31491587	C	C	T	2/5	Missense	SNP	p.T109I	309	200	109	0,35	rs150419121	possibly_damaging(0,608)	tolerated(0,07)
MEDAG	EST48T	13	31480852	G	G	-	1/5	Frame_Shift_Del	DEL	p.G69Afs*29	267	200	67	0,25	rs758738581		
MET	EST120T	7	116422111	A	A	-	18/21	Frame_Shift_Del	DEL	p.K1217Sfs*49	237	174	63	0,27			
MET	EST137T	7	116398538	T	T	C	9/21	Missense	SNP	p.Y710H	312	163	149	0,48	novel	probably_damaging(0,994)	tolerated(0,42)
MET	EST155T-A	7	116436105	C	C	G	21/21	Missense	SNP	p.S1385C	322	174	148	0,46	rs747239403	benign(0,031)	deleterious(0,04)
MET	EST187T	7	116381047	A	A	G	5/21	Missense	SNP	p.T557A	124	54	70	0,56	rs374733251	possibly_damaging(0,529)	deleterious(0,03)
MSH6	EST119T	2	48028085	G	G	A	4/10	Missense	SNP	p.R988H	426	357	66	0,15	rs115386788	benign(0,013)	tolerated(0,11)
MSH6	EST119T	2	48030640	C	C	-	5/10	Frame_Shift_Del	DEL	p.F1088Sfs*2	136	67	69	0,51	rs761724581,rs770288143		
MSH6	EST162T	2	48033981	-	-	TTGA	10/10	Frame_Shift_Ins	INS	p.K1358Dfs*2	155	59	92	0,59	rs55740729		
MSH6	EST180T	2	48030640	C	C	-	5/10	Frame_Shift_Del	DEL	p.F1088Sfs*2	193	105	83	0,43	rs761724581,rs770288143		
MSH6	EST204T-A	2	48030640	C	C	-	5/10	Frame_Shift_Del	DEL	p.F1088Sfs*2	214	52	130	0,61	rs761724581,rs770288143		
MSH6	EST212T	2	48028222	C	C	T	4/10	Missense	SNP	p.R1034W	322	160	159	0,49	rs587779930	probably_damaging(0,999)	deleterious(0)
MSH6	EST98T	2	48033370	C	C	T	8/10	Missense	SNP	p.T1225M	1464	737	727	0,50	rs63750370	probably_damaging(1)	deleterious(0)
MSH6	GCY107T	2	48027668	-	-	T	4/10	Frame_Shift_Ins	INS	p.Y850Ifs*8	58	31	27	0,47	novel		

Hugo_Symbol	Tumor_Sample_Barcode	Chromosome	Start_Position	Reference_Allele	Tumor_Seq_Allele1	Tumor_Seq_Allele2	Exon_Number	Variant_Classification	Variant_Type	HGVSp_Short	t_depth	t_ref_count	t_alt_count	t_vaf	dbSNP_RS	PolyPhen	SIFT
MUC6	EST119T	11	1013551	G	G	A	33/33	Missense	SNP	p.P2409S	38	33	5	0,13	novel	unknown(0)	
MUC6	EST136T	11	1027763	C	C	T	16/33	Missense	SNP	p.A635T	137	67	70	0,51	rs779356933	unknown(0)	
MUC6	EST140T1-1	11	1029360	G	G	T	10/33	Nonsense	SNP	p.C381*	48	40	8	0,17	rs780881997		
MUC6	EST150T	11	1036645	C	C	T	1/33	Missense	SNP	p.R4Q	8	5	3	0,38	novel	unknown(0)	
MUC6	EST180T	11	1020189	C	C	T	29/33	Missense	SNP	p.G1237R	115	91	24	0,21	rs747840669	unknown(0)	
MUC6	EST185T	11	1028271	C	C	T	14/33	Missense	SNP	p.A570T	159	99	60	0,38	rs757784693	unknown(0)	
MUC6	EST204T-A	11	1019473	C	C	T	30/33	Missense	SNP	p.V1278I	134	102	32	0,24	rs776231978	unknown(0)	
MUC6	EST205T	11	1016210	AAG	AAG	-	31/33	In_Frame_Del	DEL	p.L2197del	247	218	29	0,12	novel		
MUC6	EST205T	11	1026453	C	C	T	20/33	Missense	SNP	p.C807Y	106	52	54	0,51	novel	unknown(0)	
MUC6	EST217T	11	1016412	GAG	GAG	-	31/33	In_Frame_Del	DEL	p.S2130del	128	109	19	0,15	rs765184193		
MVK	EST119T	12	110019240	C	C	-	5/11	Frame_Shift_Del	DEL	p.A141Rfs*18	131	72	59	0,45			
MVK	EST120T	12	110019240	C	C	-	5/11	Frame_Shift_Del	DEL	p.A141Rfs*18	224	169	55	0,25			
MVK	EST212T	12	110019270	G	G	A	5/11	Missense	SNP	p.A148T	219	141	74	0,34	rs104895298	possibly_damaging(0,796)	deleterious(0,01)
MVK	GCY113T	12	110019222	G	G	A	5/11	Missense	SNP	p.V132I	1887	906	981	0,52	rs104895336	benign(0,007)	tolerated(0,24)
MYEOV	EST116T	11	69063153	G	G	A	3/3	Missense	SNP	p.R79H	239	124	113	0,47	rs117131950	benign(0)	tolerated_low_confidence(0,05)
MYEOV	EST183T	11	69063177	G	G	A	3/3	Missense	SNP	p.R87H	689	355	334	0,48	rs200120334	benign(0,151)	tolerated_low_confidence(0,2)

Hugo_Symbol	Tumor_Sample_Barcode	Chromosome	Start_Position	Reference_Allele	Tumor_Seq_Allele1	Tumor_Seq_Allele2	Exon_Number	Variant_Classification	Variant_Type	HGVSp_Short	t_depth	t_ref_count	t_alt_count	t_vaf	dbSNP_RS	PolyPhen	SIFT
NBN	EST119T	8	90965666	T	T	-	11/16	Frame_Shift_Del	DEL	p.R551Gfs*8	800	657	137	0,17			
NBN	EST157T	8	90967512	T	T	-	10/16	Frame_Shift_Del	DEL	p.R466Gfs*18	283	231	52	0,18			
NBN	EST160T	8	90965666	T	T	-	11/16	Frame_Shift_Del	DEL	p.R551Gfs*8	465	401	64	0,14			
NBN	GCY107T	8	90965809	T	T	-	11/16	Frame_Shift_Del	DEL	p.N503Ifs*26	156	111	45	0,29	novel		
NF1	EST119T	17	29664595	A	A	G	43/58	Missense	SNP	p.M2213V	123	52	71	0,58	novel	possibly_damaging(0,448)	deleterious(0,02)
NF1	EST51T	17	29685568	A	A	G	55/58	Missense	SNP	p.I2681V	855	376	479	0,56	rs146315101	benign(0)	tolerated(1)
NF1	GCY107T	17	29576010	C	C	A	30/58	Missense	SNP	p.P1328Q	153	127	26	0,17	novel	benign(0,001)	tolerated(0,5)
NF1	GCY107T	17	29664585	G	G	T	43/58	Missense	SNP	p.L2209F	96	80	16	0,17	novel	probably_damaging(0,986)	deleterious(0)
NF1	GCY107T	17	29701119	GAAG C	GAA GC	-	58/58	Frame_Shift_Del	DEL	p.Q2824Kfs*8	208	182	26	0,13	novel		
PALB2	EST108T	16	23647038	C	C	T	4/13	Missense	SNP	p.D277N	1945	1406	539	0,28	rs778309339	benign(0,001)	tolerated(0,19)
PALB2	EST122T-A	16	23634329	T	T	A	9/13	Missense	SNP	p.D986V	287	100	187	0,65	novel	probably_damaging(0,912)	deleterious(0)
PALB2	EST122T-A	16	23637711	G	G	C	7/13	Nonsense	SNP	p.S865*	188	114	74	0,39	rs746604683		
PALB2	EST157T	16	23632701	A	A	G	10/13	Missense	SNP	p.M1032T	230	193	37	0,16	rs745562326	benign(0,031)	tolerated(0,15)
PALB2	EST158T	16	23641487	C	C	A	5/13	Missense	SNP	p.R663L	442	346	96	0,22	novel	benign(0,082)	deleterious(0,01)
PALB2	EST165T-B	16	23614793	T	T	C	13/13	Missense	SNP	p.Y1183C	313	206	103	0,33	novel	probably_damaging(1)	deleterious(0)

Hugo_Symbol	Tumor_Sample_Barcode	Chromosome	Start_Position	Reference_Allele	Tumor_Seq_Allele1	Tumor_Seq_Allele2	Exon_Number	Variant_Classification	Variant_Type	HGVSp_Short	t_depth	t_ref_count	t_alt_count	t_vaf	dbSNP_RS	PolyPhen	SIFT
PALB2	EST204T-A	16	23614797	C	C	T	13/13	Missense	SNP	p.V1182I	305	210	95	0,31	novel	benign(0,015)	tolerated(0,48)
PALB2	EST209T	16	23647552	C	C	G	4/13	Missense	SNP	p.E105D	434	296	138	0,32	rs515726108	benign(0,066)	tolerated(0,06)
PAX6	EST157T	11	31812317	G	G	-	13/14	Frame_Shift_Del	DEL	p.P389Hfs*7	109	84	23	0,21	rs200015827		
PAX6	EST167T	11	31812317	G	G	-	13/14	Frame_Shift_Del	DEL	p.P389Hfs*7	137	90	47	0,34	rs200015827		
PAX6	EST167T	11	31824316	C	C	T	5/14	Missense	SNP	p.R26Q	163	143	20	0,12		probably_damaging(1)	deleterious(0)
PAX6	EST204T-A	11	31812317	G	G	-	13/14	Frame_Shift_Del	DEL	p.P389Hfs*7	97	54	43	0,44	rs200015827		
PAX6	GCY107T	11	31812322	-	-	C	13/14	Frame_Shift_Ins	INS	p.H390Tfs*36	108	71	37	0,34	novel		
PIK3CA	EST119T	3	178952085	A	A	G	21/21	Missense	SNP	p.H1047R	486	394	92	0,19	rs121913279	possibly_damaging(0,529)	tolerated(0,11)
PIK3CA	EST216T	3	178922324	G	G	A	6/21	Missense	SNP	p.E365K	340	163	177	0,52		possibly_damaging(0,705)	deleterious(0,05)
PIK3CA	EST48T	3	178916938	GAA	GAA	-	2/21	In_Frame_Del	DEL	p.E110del	1454	1189	265	0,18			
PIK3CA	GCY107T	3	178928312	G	G	T	9/21	Missense	SNP	p.V500L	81	69	12	0,15	novel	benign(0)	tolerated(0,76)
PKHD1	EST103T	6	51890503	G	G	A	32/67	Missense	SNP	p.R1369C	1935	968	967	0,50	rs368974211	possibly_damaging(0,776)	tolerated(0,18)
PKHD1	EST108T	6	51613218	C	C	T	58/67	Missense	SNP	p.V3066I	2216	615	1601	0,72	rs754544784	benign(0,075)	tolerated(0,81)
PKHD1	EST108T	6	51774257	C	C	T	40/67	Missense	SNP	p.C2169Y	1418	1047	369	0,26	rs757717736	probably_damaging(0,986)	deleterious(0)
PKHD1	EST109T-B	6	51735374	T	T	C	47/67	Missense	SNP	p.T2472A	315	172	143	0,45	rs137972951	probably_damaging(0,999)	deleterious(0,01)

Hugo_Symbol	Tumor_Sample_Barcode	Chromosome	Start_Position	Reference_Allele	Tumor_Seq_Allele1	Tumor_Seq_Allele2	Exon_Number	Variant_Classification	Variant_Type	HGVSp_Short	t_depth	t_ref_count	t_alt_count	t_vaf	dbSNP_RS	PolyPhen	SIFT
PKHD1	EST133T	6	51612999	C	C	A	58/67	Missense	SNP	p.D3139Y	320	194	126	0,39	rs45503297	benign(0,035)	tolerated(0,11)
PKHD1	EST166T	6	51484062	T	T	G	67/67	Missense	SNP	p.Q4014H	221	192	29	0,13	novel	benign(0,003)	tolerated_low_confidence(0,1)
PKHD1	EST178T	6	51613199	G	G	A	58/67	Missense	SNP	p.A3072V	438	160	276	0,63	rs139306706	benign(0,02)	tolerated(0,17)
PKHD1	EST180T	6	51890015	A	A	-	32/67	Frame_Shift_Del	DEL	p.F1531Lfs*61	314	191	123	0,39	rs777574337		
PKHD1	EST190T	6	51771039	T	T	C	41/67	Missense	SNP	p.N2261S	256	133	123	0,48	rs146102132	possibly_damaging(0,734)	tolerated(0,06)
PKHD1	EST202T	6	51612590	A	A	C	58/67	Missense	SNP	p.L3275R	332	290	42	0,13		benign(0,12)	deleterious(0)
PKHD1	EST204T-A	6	51892988	C	C	T	30/67	Missense	SNP	p.V1176I	166	86	78	0,47	rs565045703	benign(0,185)	deleterious(0,02)
PKHD1	EST212T	6	51701217	G	G	A	51/67	Missense	SNP	p.P2720S	474	334	137	0,29	rs374235991	benign(0,011)	tolerated(0,17)
PKHD1	EST215T	6	51732827	T	T	C	48/67	Missense	SNP	p.I2523V	349	134	215	0,62	rs146962673	benign(0,02)	tolerated(0,35)
PKHD1	EST45T	6	51887616	A	A	C	33/67	Missense	SNP	p.L1788W	1080	463	617	0,57	novel	probably_damaging(0,998)	deleterious(0)
PKHD1	EST46T-B	6	51768795	C	C	T	42/67	Missense	SNP	p.G2285E	603	318	285	0,47	rs142526715	benign(0,026)	tolerated(0,34)
PKHD1	EST48T	6	51927443	A	A	C	14/67	Missense	SNP	p.L331R	2021	1579	442	0,22	novel	possibly_damaging(0,521)	deleterious(0,04)
PKHD1	EST98T	6	51524570	T	T	C	61/67	Missense	SNP	p.T3452A	1927	939	988	0,51	rs562503637	benign(0,003)	tolerated(0,57)
PKHD1	GCY105T2	6	51923377	A	A	G	16/67	Missense	SNP	p.V419A	305	160	145	0,48	rs144526315	benign(0,001)	tolerated(0,83)
PKHD1	GCY107T	6	51777288	A	A	G	38/67	Missense	SNP	p.W2070R	48	41	7	0,15	novel	probably_damaging(0,999)	deleterious(0)

Hugo_Symbol	Tumor_Sample_Barcode	Chromosome	Start_Position	Reference_Allele	Tumor_Seq_Allele1	Tumor_Seq_Allele2	Exon_Number	Variant_Classification	Variant_Type	HGVSp_Short	t_depth	t_ref_count	t_alt_count	t_vaf	dbSNP_RS	PolyPhen	SIFT
PKHD1	GCY107T	6	51938340	C	C	G		Splice_Site	SNP	p.X150_splice	84	69	15	0,18	novel		
PKHD1L1	EST101T	8	110412344	G	G	A	13/78	Missense	SNP	p.R351H	1835	1111	721	0,39	rs200182716	possibly_damaging(0,755)	deleterious(0,02)
PKHD1L1	EST112T	8	110412560	T	T	G	13/78	Missense	SNP	p.L423R	99	46	53	0,54	rs28442025	benign(0,033)	tolerated(0,35)
PKHD1L1	EST155T-A	8	110447469	G	G	A	29/78	Missense	SNP	p.V1131I	271	136	132	0,49	rs376326343	benign(0,034)	tolerated(0,27)
PKHD1L1	EST157T	8	110437316	A	A	G	24/78	Missense	SNP	p.I900M	271	209	62	0,23	novel	benign(0,129)	tolerated(0,24)
PKHD1L1	EST167T	8	110464995	-	-	G	43/78	Frame_Shift_Ins	INS	p.S2190Ifs*39	439	362	77	0,18	rs772426616		
PKHD1L1	EST176T	8	110499005	C	C	T	59/78	Missense	SNP	p.R3279C	621	473	148	0,24	rs189682035	possibly_damaging(0,847)	deleterious(0)
PKHD1L1	EST181T	8	110396351	C	C	A	5/78	Missense	SNP	p.T157N	577	355	222	0,38	rs373444015	possibly_damaging(0,566)	tolerated(0,18)
PKHD1L1	EST181T	8	110412560	T	T	G	13/78	Missense	SNP	p.L423R	292	134	158	0,54	rs28442025	benign(0,033)	tolerated(0,35)
PKHD1L1	EST184T	8	110520383	T	T	C	70/78	Missense	SNP	p.F3762S	323	166	150	0,46	rs766754755	benign(0,065)	tolerated(0,15)
PKHD1L1	EST195T	8	110492245	-	-	A	55/78	Frame_Shift_Ins	INS	p.M3069Nfs*18	483	137	346	0,72	rs765681876		
PKHD1L1	EST196T	8	110432821	A	A	-	23/78	Frame_Shift_Del	DEL	p.T868Qfs*6	644	530	102	0,16	novel		
PKHD1L1	EST204T-A	8	110476722	ATG	ATG	-	49/78	In_Frame_Del	DEL	p.D2556del	513	366	147	0,29	novel		
PKHD1L1	EST214T	8	110472023	T	T	C	47/78	Missense	SNP	p.W2402R	441	236	205	0,46	rs189382288	benign(0,314)	deleterious(0)
PKHD1L1	EST214T	8	110476860	A	A	C	49/78	Missense	SNP	p.N2600T	702	582	120	0,17	novel	benign(0,003)	deleterious(0,04)

Hugo_Symbol	Tumor_Sample_Barcode	Chromosome	Start_Position	Reference_Allele	Tumor_Seq_Allele1	Tumor_Seq_Allele2	Exon_Number	Variant_Classification	Variant_Type	HGVSp_Short	t_depth	t_ref_count	t_alt_count	t_vaf	dbSNP_RS	PolyPhen	SIFT
PKHD1L1	EST45T	8	110477066	C	C	T	49/78	Nonsense	SNP	p.Q2669*	2137	1073	1064	0,50	rs72687034		
PKHD1L1	EST94T	8	110397850	G	G	C	6/78	Missense	SNP	p.R187T	1428	808	620	0,43	rs375054012	possibly_damaging(0,882)	deleterious(0,02)
PKHD1L1	GCY107T	8	110418575	G	G	T	17/78	Missense	SNP	p.A561S	65	52	13	0,20	novel	benign(0,146)	tolerated(0,1)
PKHD1L1	GCY107T	8	110450602	C	C	A	31/78	Missense	SNP	p.A1226D	361	264	97	0,27	novel	benign(0,309)	tolerated(0,1)
PKHD1L1	GCY113T	8	110477302	C	C	A	49/78	Missense	SNP	p.D2747E	350	288	62	0,18	novel	probably_damaging(0,954)	deleterious(0,01)
PKHD1L1	GCY117T2	8	110476953	T	T	A	49/78	Missense	SNP	p.F2631Y	631	370	261	0,41	rs201002812	benign(0,032)	tolerated(0,15)
PTEN	EST203T	10	89711879	-	-	A	6/9	Frame_Shift_Ins	INS	p.T167Nfs*13	145	120	25	0,17	novel		
PTEN	EST209T	10	89692961	C	C	T	5/9	Nonsense	SNP	p.Q149*	233	162	71	0,30			
PTEN	EST212T	10	89685289	A	A	-	3/9	Frame_Shift_Del	DEL	p.N63Tfs*36	140	89	51	0,36			
PTEN	EST212T	10	89720812	A	A	-	8/9	Frame_Shift_Del	DEL	p.N323Mfs*21	438	283	155	0,35			
PTEN	EST216T	10	89720726	G	G	-	8/9	Frame_Shift_Del	DEL	p.G293Efs*14	236	190	46	0,19			
PTPN23	EST119T	3	47452580	C	C	-	20/25	Frame_Shift_Del	DEL	p.P1099Lfs*61	42	28	14	0,33	novel		
PTPN23	EST138T1-1	3	47453036	G	G	A	20/25	Missense	SNP	p.E1250K	132	53	79	0,60	rs148689441	benign(0,22)	
PTPN23	EST178T	3	47453310	A	A	G	21/25	Missense	SNP	p.Q1309R	150	73	77	0,51	rs573826979	possibly_damaging(0,67)	
PTPN23	EST202T	3	47452572	G	G	C	20/25	Missense	SNP	p.G1095A	94	49	45	0,48	rs138127717	benign(0,158)	
PTPN23	GCY113T	3	47450696	G	G	C	17/25	Missense	SNP	p.K562N	2349	926	1423	0,61	rs764798655	unknown(0)	

Hugo_Symbol	Tumor_Sample_Barcode	Chromosome	Start_Position	Reference_Allele	Tumor_Seq_Allele1	Tumor_Seq_Allele2	Exon_Number	Variant_Classification	Variant_Type	HGVSp_Short	t_depth	t_ref_count	t_alt_count	t_vaf	dbSNP_RS	PolyPhen	SIFT
PTPRC	EST157T	1	198711468	G	G	A	25/33	Missense	SNP	p.R890Q	240	204	35	0,15	rs765774003	possibly_damaging(0,867)	deleterious(0,01)
PTPRC	EST201T	1	198677352	C	C	T	10/33	Missense	SNP	p.T332I	263	131	132	0,50	rs148025707	benign(0,003)	tolerated(0,18)
PTPRC	EST207T-A	1	198682103	T	T	C	12/33	Missense	SNP	p.I398T	411	111	300	0,73	rs145357582	benign(0,102)	tolerated(0,08)
PTPRC	GCY107T	1	198671642	T	T	C	6/33	Missense	SNP	p.I189T	302	266	36	0,12	rs201715157	benign(0,003)	tolerated(0,7)
PTPRC	GCY107T	1	198687326	C	C	A	14/33	Nonsense	SNP	p.Y518*	115	97	18	0,16	novel		
PTPRC	GCY107T	1	198711051	G	G	T	24/33	Missense	SNP	p.W819C	153	136	17	0,11	novel	probably_damaging(1)	deleterious(0)
RBM28	EST167T	7	127970943	-	-	C	10/19	Frame_Shift_Ins	INS	p.E353Gfs*24	229	173	56	0,24	novel		
RBM28	EST192T	7	127963629	G	G	A	13/19	Missense	SNP	p.T452M	151	85	66	0,44	rs145208220	probably_damaging(0,999)	deleterious(0)
RBM28	EST48T	7	127955067	T	T	-	17/19	Frame_Shift_Del	DEL	p.M599*	1602	1323	279	0,17	novel		
RHOA	EST100T	3	49412922	T	T	A	2/5	Missense	SNP	p.Y34F	3302	2939	363	0,11		probably_damaging(0,994)	deleterious(0,01)
RHOA	EST104T	3	49412898	T	T	C	2/5	Missense	SNP	p.Y42C	1844	1357	487	0,26		benign(0,327)	deleterious(0,01)
RHOA	EST151T	3	49412898	T	T	C	2/5	Missense	SNP	p.Y42C	266	138	128	0,48		benign(0,327)	deleterious(0,01)
RHOA	EST166T	3	49405969	A	A	C	3/5	Missense	SNP	p.L57V	129	57	72	0,56		probably_damaging(0,995)	deleterious(0,02)
RHOA	EST175T	3	49397663	T	T	-	5/5	Frame_Shift_Del	DEL	p.K187Nfs*19	508	438	70	0,14	novel		
RHOA	EST46T-B	3	49412934	A	A	-	2/5	Frame_Shift_Del	DEL	p.F30Sfs*24	2938	2530	401	0,14	novel		
RHOA	EST95T	3	49413009	C	C	A	2/5	Missense	SNP	p.R5L	2290	1978	312	0,14	rs11552758	benign(0,275)	deleterious(0)

Hugo_Symbol	Tumor_Sample_Barcode	Chromosome	Start_Position	Reference_Allele	Tumor_Seq_Allele1	Tumor_Seq_Allele2	Exon_Number	Variant_Classification	Variant_Type	HGVSp_Short	t_depth	t_ref_count	t_alt_count	t_vaf	dbSNP_RS	PolyPhen	SIFT
RHOA	GCY107T	3	49405912	C	C	A	3/5	Missense	SNP	p.D76Y	176	119	57	0,32		possibly_damaging(0,553)	deleterious(0,02)
RHOA	GCY107T	3	49413015	G	G	C	2/5	Missense	SNP	p.A3G	100	80	20	0,20	novel	benign(0,001)	tolerated(0,1)
RIMS2	EST110T	8	104927789	A	A	C	7/24	Missense	SNP	p.S627R	341	272	69	0,20		probably_damaging(1)	deleterious_low_confidence(0)
RIMS2	EST120T	8	104924347	C	C	T	6/24	Missense	SNP	p.R587C	341	283	55	0,16	rs748264099	probably_damaging(0,999)	deleterious_low_confidence(0)
RIMS2	EST133T	8	104778513	C	C	G	3/24	Missense	SNP	p.A149G	407	212	195	0,48	rs201980502	possibly_damaging(0,774)	tolerated_low_confidence(0,14)
RIMS2	EST153T-B	8	104948922	G	G	A	13/24	Missense	SNP	p.R840Q	618	461	157	0,25		probably_damaging(0,996)	tolerated_low_confidence(0,89)
RIMS2	EST158T	8	104513193	C	C	T	1/24	Missense	SNP	p.P27S	153	83	70	0,46	novel	probably_damaging(0,999)	deleterious_low_confidence(0,02)
RIMS2	EST167T	8	104933921	A	A	-	10/24	Frame_Shift_Del	DEL	p.M704Wfs*12	516	451	65	0,13	novel		
RIMS2	EST214T	8	105001632	T	T	-	17/24	Frame_Shift_Del	DEL	p.S1010Lfs*46	340	310	30	0,09	novel		
RIMS2	EST48T	8	104897996	G	G	A	4/24	Missense	SNP	p.R390Q	1837	1410	427	0,23	novel	probably_damaging(0,974)	deleterious_low_confidence(0,03)
RIMS2	GCY107T	8	104897917	C	C	A	4/24	Missense	SNP	p.H364N	99	71	28	0,28	novel	probably_damaging(0,995)	deleterious_low_confidence(0)
RNF111	EST135T1	15	59323815	C	C	A	2/14	Missense	SNP	p.S265Y	285	238	47	0,16	novel	possibly_damaging(0,731)	deleterious_low_confidence(0)
RNF111	EST158T	15	59359052	C	C	A	6/14	Missense	SNP	p.P486T	283	155	128	0,45	rs777772451	probably_damaging(0,999)	deleterious_low_confidence(0)
RNF111	EST174T	15	59350588	T	T	C	5/14	Missense	SNP	p.M402T	221	122	99	0,45	rs376497752	benign(0,03)	tolerated_low_confidence(0,32)
RNF111	EST191T	15	59323559	C	C	T	2/14	Missense	SNP	p.R180W	299	141	158	0,53	rs201081719	probably_damaging(0,967)	deleterious_low_confidence(0)
RNF111	EST201T	15	59376378	A	A	G	9/14	Missense	SNP	p.Y792C	202	169	33	0,16	rs764992385	probably_damaging(0,998)	deleterious(0)

Hugo_Symbol	Tumor_Sample_Barcode	Chromosome	Start_Position	Reference_Allele	Tumor_Seq_Allele1	Tumor_Seq_Allele2	Exon_Number	Variant_Classification	Variant_Type	HGVSp_Short	t_depth	t_ref_count	t_alt_count	t_vaf	dbSNP_RS	PolyPhen	SIFT
RNF111	GCY107T	15	59323157	G	G	T	2/14	Missense	SNP	p.A46S	149	103	46	0,31	novel	benign(0,1)	tolerated_low_confidence(0,08)
RNF43	EST117T	17	56492767	T	T	C	1/9	Missense	SNP	p.T58A	376	223	153	0,41	rs142864107	possibly_damaging(0,827)	tolerated(0,06)
RNF43	EST119T	17	56435161	C	C	-	8/9	Frame_Shift_Del	DEL	p.G659Vfs*41	158	141	17	0,11	rs769970658,rs781215815		
RNF43	EST120T	17	56435161	C	C	-	8/9	Frame_Shift_Del	DEL	p.G659Vfs*41	197	90	107	0,54	rs769970658,rs781215815		
RNF43	EST121T	17	56436149	G	G	A	8/9	Nonsense	SNP	p.R330*	173	84	89	0,51			
RNF43	EST157T	17	56435161	C	C	-	8/9	Frame_Shift_Del	DEL	p.G659Vfs*41	167	140	27	0,16	rs769970658,rs781215815		
RNF43	EST157T	17	56435185	T	T	C	8/9	Missense	SNP	p.H651R	221	168	53	0,24	novel	possibly_damaging(0,611)	deleterious_low_confidence(0,05)
RNF43	EST157T	17	56492767	T	T	C	1/9	Missense	SNP	p.T58A	300	140	160	0,53	rs142864107	possibly_damaging(0,827)	tolerated(0,06)
RNF43	EST160T	17	56435161	C	C	-	8/9	Frame_Shift_Del	DEL	p.G659Vfs*41	175	115	45	0,26	rs769970658,rs781215815		
RNF43	EST162T	17	56436044	C	C	T	8/9	Missense	SNP	p.A365T	83	27	56	0,67	rs79309393	benign(0,001)	tolerated(0,41)
RNF43	EST165T-B	17	56439918	C	C	T	5/9	Missense	SNP	p.R225H	84	42	42	0,50	rs367688879	benign(0,002)	tolerated(0,22)
RNF43	EST167T	17	56435161	C	C	-	8/9	Frame_Shift_Del	DEL	p.G659Vfs*41	250	174	76	0,30	rs769970658,rs781215815		
RNF43	EST180T	17	56435161	C	C	-	8/9	Frame_Shift_Del	DEL	p.G659Vfs*41	148	90	58	0,39	rs769970658,rs781215815		
RNF43	EST204T-A	17	56435161	-	-	CC	8/9	Frame_Shift_Ins	INS	p.P660Vfs*41	103	30	51	0,50	rs769970658,rs781215815		

Hugo_Symbol	Tumor_Sample_Barcode	Chromosome	Start_Position	Reference_Allele	Tumor_Seq_Allele1	Tumor_Seq_Allele2	Exon_Number	Variant_Classification	Variant_Type	HGVSp_Short	t_depth	t_ref_count	t_alt_count	t_vaf	dbSNP_RS	PolyPhen	SIFT
RNF43	EST212T	17	56435161	C	C	-	8/9	Frame_Shift_Del	DEL	p.G659Vfs*41	177	58	119	0,67	rs769970658,rs781215815		
RNF43	EST46T-B	17	56435161	C	C	-	8/9	Frame_Shift_Del	DEL	p.G659Vfs*41	1409	1190	216	0,15	rs769970658,rs781215815		
RNF43	EST48T	17	56435161	C	C	-	8/9	Frame_Shift_Del	DEL	p.G659Vfs*41	994	740	249	0,25	rs769970658,rs781215815		
RNF43	EST48T	17	56435455	C	C	T	8/9	Missense	SNP	p.R561Q	2149	1576	570	0,27	rs553934414	benign(0,003)	tolerated_low_confidence(0,19)
RNF43	EST48T	17	56438159	CTC	CTC	-	6/9	In_Frame_Del	DEL	p.E278del	758	638	120	0,16			
RNF43	EST98T	17	56435590	T	T	A	8/9	Missense	SNP	p.D516V	2112	1096	1016	0,48		benign(0,097)	tolerated(0,09)
RPL22	EST108T	1	6257786	T	T	-	2/4	Frame_Shift_Del	DEL	p.K15Rfs*5	650	509	136	0,21	rs765504428		
RPL22	EST119T	1	6257785	TT	TT	-	2/4	Frame_Shift_Del	DEL	p.K15Efs*9	77	55	17	0,22	rs765504428		
RPL22	EST120T	1	6257786	T	T	-	2/4	Frame_Shift_Del	DEL	p.K15Rfs*5	91	74	17	0,19	rs765504428		
RPL22	EST157T	1	6257786	T	T	-	2/4	Frame_Shift_Del	DEL	p.K15Rfs*5	48	33	15	0,31	rs765504428		
RPL22	EST160T	1	6257786	T	T	-	2/4	Frame_Shift_Del	DEL	p.K15Rfs*5	68	46	22	0,32	rs765504428		
RPL22	EST167T	1	6257786	T	T	-	2/4	Frame_Shift_Del	DEL	p.K15Rfs*5	95	40	55	0,58	rs765504428		
RPL22	EST175T	1	6257786	T	T	-	2/4	Frame_Shift_Del	DEL	p.K15Rfs*5	142	117	25	0,18	rs765504428		
RPL22	EST180T	1	6257786	T	T	-	2/4	Frame_Shift_Del	DEL	p.K15Rfs*5	47	31	16	0,34	rs765504428		
RPL22	EST204T-A	1	6257786	-	-	T	2/4	Frame_Shift_Ins	INS	p.K16Efs*9	36	21	15	0,42	rs765504428		
RPL22	EST212T	1	6257786	T	T	-	2/4	Frame_Shift_Del	DEL	p.K15Rfs*5	75	37	38	0,51	rs765504428		

Hugo_Symbol	Tumor_Sample_Barcode	Chromosome	Start_Position	Reference_Allele	Tumor_Seq_Allele1	Tumor_Seq_Allele2	Exon_Number	Variant_Classification	Variant_Type	HGVSp_Short	t_depth	t_ref_count	t_alt_count	t_vaf	dbSNP_RS	PolyPhen	SIFT
RPL22	EST46T-B	1	6257786	T	T	-	2/4	Frame_Shift_Del	DEL	p.K15Rfs*5	584	486	88	0,15	rs765504428		
RPL22	EST48T	1	6257786	T	T	-	2/4	Frame_Shift_Del	DEL	p.K15Rfs*5	493	241	247	0,50	rs765504428		
SERPIN8	EST173T	18	61652384	G	G	C	6/7	Missense	SNP	p.D209H	311	197	114	0,37	novel	possibly_damaging(0,726)	tolerated(0,07)
SERPIN8	EST216T	18	61654210	G	G	A	7/7	Missense	SNP	p.E275K	345	131	214	0,62	rs148947974	benign(0,374)	deleterious(0,02)
SMAD4	EST101T	18	48591919	G	G	A	9/12	Missense	SNP	p.R361H	1257	432	825	0,66	rs377767347	probably_damaging(1)	deleterious(0,03)
SMAD4	EST154T	18	48591892	G	G	A	9/12	Missense	SNP	p.G352E	261	136	125	0,48	rs377767345	probably_damaging(1)	deleterious(0)
SMAD4	EST212T	18	48584513	-	-	G	6/12	Frame_Shift_Ins	INS	p.S232Qfs*3	211	153	58	0,27			
SMAD4	EST216T	18	48581182	TG	TG	-	5/12	Frame_Shift_Del	DEL	p.V163Afs*2	170	120	50	0,29	novel		
SMAD4	GCY107T	18	48581322	C	C	A	5/12	Missense	SNP	p.T209N	39	23	16	0,41	novel	benign(0,031)	tolerated(0,52)
SMARCA4	EST118T	19	11134251	C	C	T	21/36	Missense	SNP	p.R973W	232	140	92	0,40		probably_damaging(0,998)	
SMARCA4	EST119T	19	11096079	AAG	AAG	-	4/36	In_Frame_Del	DEL	p.Q118_G119delinsF	28	24	4	0,14	novel		
SMARCA4	EST119T	19	11132428	G	G	A	20/36	Missense	SNP	p.E882K	150	113	37	0,25		possibly_damaging(0,692)	
SMARCA4	EST136T	19	11097224	G	G	C	5/36	Missense	SNP	p.G239R	165	58	107	0,65	rs761515593	possibly_damaging(0,754)	
SMARCA4	EST138T1-1	19	11094940	C	C	-	3/36	Frame_Shift_Del	DEL	p.A39Pfs*4	135	98	37	0,27	novel		
SMARCA4	EST149T	19	11094865	G	G	A	3/36	Missense	SNP	p.R13Q	80	50	30	0,38	rs143950084	unknown(0)	
SMARCA4	EST166T	19	11141426	C	C	T	26/36	Missense	SNP	p.R1135W	143	62	81	0,57	rs11537676	probably_damaging(1)	
SMARCA4	GCY107T	19	11105546	G	G	A	10/36	Missense	SNP	p.E488K	52	36	16	0,31	novel	possibly_damaging(0,792)	

Hugo_Symbol	Tumor_Sample_Barcode	Chromosome	Start_Position	Reference_Allele	Tumor_Seq_Allele1	Tumor_Seq_Allele2	Exon_Number	Variant_Classification	Variant_Type	HGVSp_Short	t_depth	t_ref_count	t_alt_count	t_vaf	dbSNP_RS	PolyPhen	SIFT
SMARCA4	GCY107T	19	11118609	A	A	G	15/36	Missense	SNP	p.Q678R	22	16	6	0,27	novel	benign(0,001)	
SMARCB1	EST119T	22	24135755	A	A	G	3/9	Missense	SNP	p.Y81C	255	207	48	0,19	novel	benign(0,002)	deleterious(0,03)
SMARCB1	EST160T	22	24145519	G	G	A	5/9	Missense	SNP	p.A180T	164	139	23	0,14	novel	possibly_damaging(0,869)	deleterious(0)
SOHLH2	EST119T	13	36744807	G	G	-	15/16	Frame_Shift_Del	DEL	p.P450Lfs*8	189	157	32	0,17	rs755636521		
SOHLH2	GCY107T	13	36767781	C	C	A	9/16	Missense	SNP	p.W213L	219	181	38	0,17	novel	probably_damaging(0,998)	deleterious(0)
SPTA1	EST108T	1	158606451	C	C	A	37/52	Missense	SNP	p.A1764S	1387	1223	164	0,12	novel	probably_damaging(0,999)	tolerated(0,49)
SPTA1	EST119T	1	158582722	G	G	A	51/52	Missense	SNP	p.T2340I	216	170	46	0,21	rs745909299	benign(0,06)	tolerated(0,11)
SPTA1	EST138T1-1	1	158609676	T	T	C	34/52	Missense	SNP	p.E1620G	323	253	70	0,22	novel	possibly_damaging(0,688)	deleterious(0)
SPTA1	EST153T-B	1	158617473	T	T	A	27/52	Missense	SNP	p.E1251V	402	346	56	0,14	novel	benign(0,134)	deleterious(0,02)
SPTA1	EST157T	1	158614044	T	T	C	30/52	Missense	SNP	p.Q1446R	311	271	38	0,12	novel	probably_damaging(0,991)	deleterious(0,04)
SPTA1	EST157T	1	158623199	T	T	C	22/52	Missense	SNP	p.E1018G	179	147	32	0,18	novel	probably_damaging(1)	deleterious(0)
SPTA1	EST157T	1	158644464	A	A	G	9/52	Missense	SNP	p.Y372H	83	68	15	0,18	novel	probably_damaging(0,974)	deleterious(0,04)
SPTA1	EST167T	1	158609722	C	C	A	34/52	Nonsense	SNP	p.E1605*	381	308	71	0,19	novel		
SPTA1	EST177T	1	158644435	T	T	A	9/52	Missense	SNP	p.E381D	170	133	37	0,22	novel	probably_damaging(0,999)	tolerated(1)
SPTA1	EST181T	1	158645965	T	T	A	8/52	Missense	SNP	p.T360S	497	272	225	0,45	rs34133563	possibly_damaging(0,734)	tolerated(0,49)
SPTA1	EST182T	1	158595952	G	G	A	42/52	Missense	SNP	p.T1965I	627	372	255	0,41	novel	benign(0,026)	tolerated(0,12)

Hugo_Symbol	Tumor_Sample_Barcode	Chromosome	Start_Position	Reference_Allele	Tumor_Seq_Allele1	Tumor_Seq_Allele2	Exon_Number	Variant_Classification	Variant_Type	HGVSp_Short	t_depth	t_ref_count	t_alt_count	t_vaf	dbSNP_RS	PolyPhen	SIFT
SPTA1	EST182T	1	158606546	T	T	G	37/52	Missense	SNP	p.K1732T	512	451	61	0,12	rs370558180	probably_damaging(0,998)	deleterious(0)
SPTA1	EST183T	1	158609673	A	A	T	34/52	Missense	SNP	p.F1621Y	997	554	435	0,44	rs374298000	benign(0,052)	tolerated(0,06)
SPTA1	EST183T	1	158648254	C	C	T	6/52	Missense	SNP	p.R250H	615	257	358	0,58	rs759192785	benign(0,002)	tolerated(0,73)
SPTA1	EST191T	1	158606546	T	T	G	37/52	Missense	SNP	p.K1732T	264	120	144	0,55	rs370558180	probably_damaging(0,998)	deleterious(0)
SPTA1	EST212T	1	158622402	C	C	T	23/52	Missense	SNP	p.R1077H	280	174	106	0,38	rs199612744	benign(0,002)	tolerated(0,17)
SPTA1	EST91T	1	158627418	C	C	T	19/52	Missense	SNP	p.R885H	2248	1070	1178	0,52	rs370989483	benign(0,007)	tolerated(0,08)
SPTA1	GCY107T	1	158590181	AG	AG	-	44/52	Frame_Shift_Del	DEL	p.L2066Vfs*11	163	148	15	0,09	novel		
STARD13	EST120T	13	33686987	G	G	A	9/14	Missense	SNP	p.T788M	259	209	50	0,19	rs758687884	possibly_damaging(0,687)	deleterious(0,04)
STARD13	EST149T	13	33859648	C	C	T	1/14	Missense	SNP	p.R43Q	185	98	87	0,47	novel	possibly_damaging(0,667)	deleterious(0,04)
STARD13	EST160T	13	33704176	C	C	T	5/14	Missense	SNP	p.G213D	173	139	34	0,20	rs775714821	possibly_damaging(0,461)	tolerated(0,17)
STARD13	EST187T	13	33684987	C	C	T	11/14	Missense	SNP	p.V889M	170	112	57	0,34	rs143936149	benign(0,157)	deleterious(0,01)
STARD13	EST198T	13	33703180	C	C	T	5/14	Missense	SNP	p.R545Q	324	167	154	0,48	rs201883988	benign(0,003)	tolerated(0,6)
STARD13	EST209T	13	33687059	T	T	C	9/14	Missense	SNP	p.K764R	166	65	101	0,61	rs199768711	benign(0,251)	deleterious(0,01)
STARD13	EST46T-B	13	33703274	G	G	C	5/14	Missense	SNP	p.H514D	2484	1426	1058	0,43	rs143961677	benign(0)	tolerated(0,93)
STARD13	GCY23M	13	33703738	C	C	T	5/14	Missense	SNP	p.R359H	192	84	108	0,56	rs200449699	probably_damaging(0,999)	deleterious(0,04)
TBL1XR1	EST207T-A	3	176750811	C	C	T	14/16	Missense	SNP	p.R455K	513	352	161	0,31	rs761590111	benign(0,002)	tolerated(1)

Hugo_Symbol	Tumor_Sample_Barcode	Chromosome	Start_Position	Reference_Allele	Tumor_Seq_Allele1	Tumor_Seq_Allele2	Exon_Number	Variant_Classification	Variant_Type	HGVSp_Short	t_depth	t_ref_count	t_alt_count	t_vaf	dbSNP_RS	PolyPhen	SIFT
TBL1XR1	EST212T	3	176769342	T	T	-	5/16	Frame_Shift_Del	DEL	p.N126Mfs*16	352	223	129	0,37			
TGFBR2	EST108T	3	30691873	A	A	-	4/8	Frame_Shift_Del	DEL	p.K153Sfs*35	1090	502	562	0,52			
TGFBR2	EST116T	3	30691873	A	A	-	4/8	Frame_Shift_Del	DEL	p.K153Sfs*35	178	156	22	0,12			
TGFBR2	EST119T	3	30691873	A	A	-	4/8	Frame_Shift_Del	DEL	p.K153Sfs*35	223	162	61	0,27			
TGFBR2	EST120T	3	30691873	A	A	-	4/8	Frame_Shift_Del	DEL	p.K153Sfs*35	222	98	120	0,54			
TGFBR2	EST140T1-1	3	30664732	A	A	C	2/8	Missense	SNP	p.S46R	183	83	100	0,55	rs200111443	benign(0,01)	tolerated_low_confidence(0,13)
TGFBR2	EST157T	3	30691873	A	A	-	4/8	Frame_Shift_Del	DEL	p.K153Sfs*35	206	126	75	0,36			
TGFBR2	EST158T	3	30713619	C	C	T	5/8	Missense	SNP	p.T340M	335	187	148	0,44	rs34833812	benign(0,103)	deleterious(0,04)
TGFBR2	EST160T	3	30691873	A	A	-	4/8	Frame_Shift_Del	DEL	p.K153Sfs*35	224	168	56	0,25			
TGFBR2	EST160T	3	30713619	C	C	T	5/8	Missense	SNP	p.T340M	272	159	113	0,42	rs34833812	benign(0,103)	deleterious(0,04)
TGFBR2	EST167T	3	30691872	AA	AA	-	4/8	Frame_Shift_Del	DEL	p.K153Afs*3	228	118	70	0,31			
TGFBR2	EST175T	3	30691873	A	A	-	4/8	Frame_Shift_Del	DEL	p.K153Sfs*35	450	331	119	0,26			
TGFBR2	EST180T	3	30691873	A	A	-	4/8	Frame_Shift_Del	DEL	p.K153Sfs*35	184	130	41	0,22			
TGFBR2	EST187T	3	30691932	ACA	ACA	-	4/8	In_Frame_Del	DEL	p.N171del	128	93	35	0,27	novel		
TGFBR2	EST204T-A	3	30691873	A	A	-	4/8	Frame_Shift_Del	DEL	p.K153Sfs*35	151	47	104	0,69			
TGFBR2	EST212T	3	30691873	A	A	-	4/8	Frame_Shift_Del	DEL	p.K153Sfs*35	189	35	154	0,81			
TGFBR2	EST46T-B	3	30691873	A	A	-	4/8	Frame_Shift_Del	DEL	p.K153Sfs*35	1704	1050	607	0,36			
TGFBR2	EST48T	3	30691873	A	A	-	4/8	Frame_Shift_Del	DEL	p.K153Sfs*35	1332	621	637	0,48			

Hugo_Symbol	Tumor_Sample_Barcode	Chromosome	Start_Position	Reference_Allele	Tumor_Seq_Allele1	Tumor_Seq_Allele2	Exon_Number	Variant_Classification	Variant_Type	HGVSp_Short	t_depth	t_ref_count	t_alt_count	t_vaf	dbSNP_RS	PolyPhen	SIFT
THBS1	EST167T	15	39885621	G	G	A	19/22	Missense	SNP	p.D1007N	308	239	69	0,22	novel	probably_damaging(1)	deleterious(0)
THBS1	EST91T	15	39876537	C	C	T	6/22	Missense	SNP	p.R314W	1498	1234	264	0,18		benign(0)	deleterious(0,01)
THBS1	GCY107T	15	39880343	-	-	TAA	9/22	Nonsense	INS	p.P465_S466ins*	231	209	22	0,10	novel		
THSD7B	EST140T1-1	2	138000044	G	G	A	9/28	Missense	SNP	p.R723Q	266	136	130	0,49	rs76693568	possibly_damaging(0,776)	deleterious(0)
THSD7B	EST151T	2	138421046	A	A	T	26/28	Nonsense	SNP	p.K1521*	354	292	62	0,18	rs79573881		
THSD7B	EST182T	2	138030126	C	C	T	10/28	Nonsense	SNP	p.R764*	444	220	224	0,50			
THSD7B	EST214T	2	137814076	A	A	G	2/28	Missense	SNP	p.S76G	563	486	77	0,14	rs546067581	benign(0,294)	deleterious(0)
THSD7B	GCY107T	2	137814447	G	G	C	2/28	Missense	SNP	p.L199F	365	325	40	0,11	novel	probably_damaging(0,972)	deleterious(0,01)
THSD7B	GCY107T	2	137814455	G	G	T	2/28	Missense	SNP	p.R202I	384	344	40	0,10	novel	probably_damaging(0,983)	deleterious(0)
THSD7B	GCY107T	2	138169344	C	C	G	13/28	Missense	SNP	p.A954G	131	84	47	0,36	rs368768637	possibly_damaging(0,567)	tolerated(1)
TMEM63A	EST115T	1	226034840	CTG	CTG	-	24/25	In_Frame_Del	DEL	p.Q775del	25	21	4	0,16	rs776965803		
TMEM63A	EST188T	1	226034840	CTG	CTG	-	24/25	In_Frame_Del	DEL	p.Q775del	45	40	5	0,11	rs776965803		
TMEM63A	EST193T	1	226034840	CTG	CTG	-	24/25	In_Frame_Del	DEL	p.Q775del	27	22	5	0,19	rs776965803		
TMEM63A	EST205T	1	226065205	G	G	A	3/25	Missense	SNP	p.R26W	364	199	165	0,45	rs373127251	benign(0,208)	deleterious(0,04)
TMEM63A	GCY105T2	1	226034840	CTG	CTG	-	24/25	In_Frame_Del	DEL	p.Q775del	50	46	4	0,08	rs776965803		
TMEM63A	GCY107T	1	226047029	C	C	A	15/25	Missense	SNP	p.G415V	74	54	20	0,27		probably_damaging(0,99)	deleterious(0,01)

Hugo_Symbol	Tumor_Sample_Barcode	Chromosome	Start_Position	Reference_Allele	Tumor_Seq_Allele1	Tumor_Seq_Allele2	Exon_Number	Variant_Classification	Variant_Type	HGVSp_Short	t_depth	t_ref_count	t_alt_count	t_vaf	dbSNP_RS	PolyPhen	SIFT
TMEM63A	GCY117T2	1	226037727	C	C	T	21/25	Missense	SNP	p.V653I	208	90	118	0,57	rs145863221	benign(0,006)	deleterious(0,03)
TP53	EST100T	17	7576852	C	C	A		Splice_Site	SNP	p.X331_splice	2412	2031	381	0,16	rs11575997		
TP53	EST103T	17	7578457	C	C	T	5/11	Missense	SNP	p.R158H	952	844	108	0,11	rs587782144	benign(0,438)	tolerated(0,1)
TP53	EST105T	17	7577125	CTCA AAGC TGTT CCG	CTC AAA GCT GTT CCG	-	8/11	In_Frame_Del	DEL	p.R267_E271del	1918	1724	193	0,10	novel		
TP53	EST110T	17	7577120	C	C	T	8/11	Missense	SNP	p.R273H	268	220	46	0,17	rs28934576	possibly_damaging(0,631)	tolerated(0,13)
TP53	EST120T	17	7578407	G	G	A	5/11	Missense	SNP	p.R175C	124	89	35	0,28	rs138729528	probably_damaging(0,993)	deleterious(0)
TP53	EST123T	17	7578403	C	C	A	5/11	Missense	SNP	p.C176F	185	120	65	0,35		probably_damaging(0,993)	deleterious(0)
TP53	EST153T-B	17	7577121	G	G	A	8/11	Missense	SNP	p.R273C	168	57	111	0,66	rs121913343	probably_damaging(0,998)	deleterious(0)
TP53	EST156T-A	17	7578464	GGG TGCC GGG CGG	GGG TGC CGG GCC G	-	5/11	Frame_Shift_Del	DEL	p.P152Afs*14	134	76	58	0,43			
TP53	EST157T	17	7574003	G	G	A	10/11	Nonsense	SNP	p.R342*	121	103	18	0,15	rs730882029		
TP53	EST157T	17	7577121	G	G	A	8/11	Missense	SNP	p.R273C	132	106	26	0,20	rs121913343	probably_damaging(0,998)	deleterious(0)
TP53	EST158T	17	7578190	T	T	C	6/11	Missense	SNP	p.Y220C	294	133	159	0,54	rs121912666	probably_damaging(1)	deleterious(0)
TP53	EST162T	17	7577538	C	C	T	7/11	Missense	SNP	p.R248Q	119	66	53	0,45	rs11540652	probably_damaging(1)	deleterious(0)

Hugo_Symbol	Tumor_Sample_Barcode	Chromosome	Start_Position	Reference_Allele	Tumor_Seq_Allele1	Tumor_Seq_Allele2	Exon_Number	Variant_Classification	Variant_Type	HGVSp_Short	t_depth	t_ref_count	t_alt_count	t_vaf	dbSNP_RS	PolyPhen	SIFT
TP53	EST164T	17	7574018	G	G	A	10/11	Missense	SNP	p.R337C	152	89	63	0,41	rs587782529	benign(0,344)	tolerated(0,09)
TP53	EST165T-B	17	7579323	-	-	T	4/11	Frame_Shift_Ins	INS	p.V122Sfs*27	107	56	51	0,48	novel		
TP53	EST167T	17	7577121	G	G	A	8/11	Missense	SNP	p.R273C	221	169	51	0,23	rs121913343	probably_damaging(0,998)	deleterious(0)
TP53	EST167T	17	7577548	C	C	T	7/11	Missense	SNP	p.G245S	194	140	51	0,26	rs28934575	probably_damaging(1)	deleterious(0)
TP53	EST176T	17	7577022	G	G	A	8/11	Nonsense	SNP	p.R306*	103	67	36	0,35	rs121913344		
TP53	EST182T	17	7579470	-	-	G	4/11	Frame_Shift_Ins	INS	p.V73Rfs*76	127	100	27	0,21	rs730882018		
TP53	EST188T	17	7578532	A	A	T	5/11	Missense	SNP	p.M133K	125	79	46	0,37	rs28934873	benign(0,122)	deleterious(0)
TP53	EST189T	17	7578406	C	C	T	5/11	Missense	SNP	p.R175H	65	47	18	0,28	rs28934578	benign(0,308)	tolerated(0,11)
TP53	EST190T	17	7574003	G	G	A	10/11	Nonsense	SNP	p.R342*	120	66	54	0,45	rs730882029		
TP53	EST193T	17	7577539	G	G	A	7/11	Missense	SNP	p.R248W	136	102	34	0,25	rs121912651	probably_damaging(1)	deleterious(0)
TP53	EST196T	17	7577022	G	G	A	8/11	Nonsense	SNP	p.R306*	191	122	69	0,36	rs121913344		
TP53	EST198T	17	7574018	G	G	A	10/11	Missense	SNP	p.R337C	98	45	53	0,54	rs587782529	benign(0,344)	tolerated(0,09)
TP53	EST199T	17	7577098	T	T	A	8/11	Missense	SNP	p.R280S	172	90	82	0,48		possibly_damaging(0,646)	deleterious(0,03)
TP53	EST207T-A	17	7577538	C	C	T	7/11	Missense	SNP	p.R248Q	125	48	77	0,62	rs11540652	probably_damaging(1)	deleterious(0)
TP53	EST209T	17	7578475	G	G	A	5/11	Missense	SNP	p.P152L	131	110	21	0,16	rs587782705	probably_damaging(0,91)	tolerated(0,08)
TP53	EST217T	17	7578406	C	C	T	5/11	Missense	SNP	p.R175H	35	24	11	0,31	rs28934578	benign(0,308)	tolerated(0,11)
TP53	EST43T-A	17	7577026	AGTG	AGTG	-	8/11	Frame_Shift_Del	DEL	p.S303Rfs*41	538	470	68	0,13	novel		

Hugo_Symbol	Tumor_Sample_Barcode	Chromosome	Start_Position	Reference_Allele	Tumor_Seq_Allele1	Tumor_Seq_Allele2	Exon_Number	Variant_Classification	Variant_Type	HGVSp_Short	t_depth	t_ref_count	t_alt_count	t_vaf	dbSNP_RS	PolyPhen	SIFT
TP53	EST43T-A	17	7577031	TCCC TGG GG	TCC CTG GGG	-	8/11	In_Frame_Del	DEL	p.P300_S303delinsF	581	512	69	0,12	novel		
TP53	EST46T-B	17	7578457	C	C	T	5/11	Missense	SNP	p.R158H	1329	1149	180	0,14	rs587782144	benign(0,438)	tolerated(0,1)
TP53	EST47T-B	17	7578208	T	T	C	6/11	Missense	SNP	p.H214R	2655	1051	1604	0,60		probably_damaging(0,922)	deleterious(0,02)
TP53	EST48T	17	7577121	G	G	A	8/11	Missense	SNP	p.R273C	1558	1286	269	0,17	rs121913343	probably_damaging(0,998)	deleterious(0)
TP53	EST91T	17	7577085	C	C	T	8/11	Missense	SNP	p.E285K	1592	1236	356	0,22	rs112431538	probably_damaging(0,985)	deleterious(0)
TP53	EST92T	17	7577036	G	G	-	8/11	Frame_Shift_Del	DEL	p.P301Qfs*44	2212	1826	386	0,17			
TP53	EST94T	17	7579361	A	A	T	4/11	Missense	SNP	p.F109Y	911	688	223	0,24		probably_damaging(0,999)	deleterious(0,01)
TP53	EST97T	17	7579362	A	A	C	4/11	Missense	SNP	p.F109V	1494	1271	223	0,15		probably_damaging(1)	deleterious(0)
TP53	EST97T	17	7579373	C	C	T	4/11	Missense	SNP	p.G105D	1571	1346	223	0,14	rs587781504	probably_damaging(1)	deleterious(0)
VPS13A	EST163T-B	9	79840851	A	A	G	14/72	Missense	SNP	p.K391E	148	90	58	0,39	novel	possibly_damaging(0,488)	deleterious(0,04)
VPS13A	EST180T	9	79836219	A	A	-	13/72	Frame_Shift_Del	DEL	p.K372Sfs*2	360	241	119	0,33	rs779822889		
VPS13A	EST181T	9	79816308	A	A	C	3/72	Missense	SNP	p.K58Q	308	156	152	0,49	rs201490407	probably_damaging(0,987)	deleterious(0)
VPS13A	EST198T	9	79930208	G	G	A	38/72	Missense	SNP	p.M1484I	304	214	90	0,30	novel	probably_damaging(0,995)	deleterious(0)
VPS13A	GCY107T	9	79895076	-	-	CG	27/72	Frame_Shift_Ins	INS	p.E943Rfs*21	169	146	23	0,14	novel		
VPS13A	GCY107T	9	79934586	C	C	G	42/72	Missense	SNP	p.I1804M	123	109	14	0,11	novel	benign(0,361)	deleterious(0,03)

Hugo_Symbol	Tumor_Sample_Barcode	Chromosome	Start_Position	Reference_Allele	Tumor_Seq_Allele1	Tumor_Seq_Allele2	Exon_Number	Variant_Classification	Variant_Type	HGVSp_Short	t_depth	t_ref_count	t_alt_count	t_vaf	dbSNP_RS	PolyPhen	SIFT
VPS13A	GCY107T	9	79954460	GT	GT	-	48/72	Frame_Shift_Del	DEL	p.S2136Rfs*14	192	157	35	0,18	novel		
VPS13A	GCY107T	9	79966237	C	C	-	53/72	Frame_Shift_Del	DEL	p.L2432Sfs*4	140	125	15	0,11	novel		
XRCC2	EST157T	7	152345769	T	T	-	3/3	Frame_Shift_Del	DEL	p.K267Nfs*30	239	203	36	0,15			
ZBTB20	EST106T	3	114099203	C	C	G	3/5	Missense	SNP	p.E20D	1524	763	761	0,50	novel	possibly_damaging(0,636)	deleterious_low_confidence(0)
ZBTB20	EST108T	3	114070057	G	G	A	4/5	Missense	SNP	p.R290C	1169	1000	169	0,14	novel	probably_damaging(0,973)	deleterious_low_confidence(0)
ZBTB20	EST120T	3	114058042	C	C	T	5/5	Missense	SNP	p.R679Q	256	227	29	0,11	novel	possibly_damaging(0,885)	deleterious(0,01)
ZBTB20	EST120T	3	114070510	C	C	T	4/5	Missense	SNP	p.D139N	193	160	33	0,17	novel	probably_damaging(0,989)	deleterious(0)
ZBTB20	EST120T	3	114099073	A	A	G	3/5	Missense	SNP	p.S64P	254	196	58	0,23	novel	possibly_damaging(0,665)	deleterious_low_confidence(0)
ZBTB20	EST153T-B	3	114429162	T	T	C		Splice_Site	SNP		314	197	115	0,37	rs192545692		
ZBTB20	EST157T	3	114058003	G	G	-	5/5	Frame_Shift_Del	DEL	p.P692Lfs*43	157	107	50	0,32	rs758277701		
ZBTB20	EST160T	3	114058003	G	G	-	5/5	Frame_Shift_Del	DEL	p.P692Lfs*43	221	179	42	0,19	rs758277701		
ZBTB20	EST208T	3	114069910	A	A	G	4/5	Missense	SNP	p.Y339H	240	123	117	0,49	novel	probably_damaging(0,969)	tolerated_low_confidence(0,18)
ZBTB20	EST212T	3	114058003	G	G	-	5/5	Frame_Shift_Del	DEL	p.P692Lfs*43	120	60	44	0,37	rs758277701		
ZBTB20	EST45T	3	114099211	C	C	T	3/5	Missense	SNP	p.E18K	1443	676	767	0,53	novel	possibly_damaging(0,636)	deleterious_low_confidence(0)
ZBTB20	EST46T-B	3	114058003	G	G	-	5/5	Frame_Shift_Del	DEL	p.P692Lfs*43	1392	1001	391	0,28	rs758277701		
ZIC4	EST108T	3	147108751	G	G	A	4/5	Missense	SNP	p.A374V	692	394	296	0,43		probably_damaging(0,939)	tolerated_low_confidence(0,1)
ZIC4	EST111T-A	3	147108742	G	G	A	4/5	Missense	SNP	p.A377V	35	21	14	0,40	rs537155873	benign(0,001)	tolerated_low_confidence(0,36)

Hugo_Symbol	Tumor_Sample_Barcode	Chromosome	Start_Position	Reference_Allele	Tumor_Seq_Allele1	Tumor_Seq_Allele2	Exon_Number	Variant_Classification	Variant_Type	HGVSp_Short	t_depth	t_ref_count	t_alt_count	t_vaf	dbSNP_RS	PolyPhen	SIFT
ZIC4	EST167T	3	147114136	C	C	T	3/5	Missense	SNP	p.R114H	100	75	25	0,25	rs763054754	benign(0,001)	tolerated(0,25)