

**DETECÇÃO DE DNA TUMORAL EM CÂNCER
GÁSTRICO E AVALIAÇÃO DE SUA UTILIDADE NO
CONTEXTO DE BIÓPSIAS LÍQUIDAS**

MELISSA POOL PIZZI

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

Área de Concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Emmanuel Dias-Neto

Co-Orientadora: Dra. Diana Noronha Nunes

São Paulo

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Pizzi, Melissa Pool

Detecção de DNA tumoral em câncer gástrico e a avaliação de sua utilidade no contexto de biópsias líquidas / Melissa Pool Pizzi – São Paulo; 2016.

141p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: Emmanuel Dias-Neto

Descritores: 1. NEOPLASIAS DO ESTÔMAGO. 2. SEQUENCIAMENTO DE NUCLEOTÍDEOS EM LARGA ESCALA. 3. MUTAÇÕES/genética. 4. BIOMARCADORES

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos pacientes que sofreram e sofrem pelo câncer de estômago, mas, principalmente, para aqueles que aceitaram a participar deste trabalho com plena consciência de que não se beneficiariam dos resultados. Conversar com eles e ouvir suas histórias, alegrias e aflições foram a parte mais importante deste trabalho.

O crescimento pessoal obtido neste percurso foi e será refletido na dedicação em trazer um pouco de alegria e esperança (pessoal e científica), para aqueles que um dia sofrerão desta neoplasia.

AGRADECIMENTOS

Aos pacientes que aceitaram a participar deste estudo, voluntariamente.

Aos meus orientadores, Dr. Emmanuel Dias-Neto e Dra. Diana Noronha Nunes pela oportunidade de desenvolver este trabalho. Pela confiança e dedicação depositada em mim. Além de terem me ajudado no crescimento científico também me ajudaram no crescimento pessoal. Queria agradecer especialmente por sempre me apoiarem nas minhas decisões como orientadores e como amigos. E acima de tudo, obrigada por me despertarem o amor pelo que faço.

À minha família, especialmente minha prima Ariane Luiz Chair por ter me dado a oportunidade de desenvolver esse passo importante em minha vida, mas, além disso, por ter sido uma irmã mais velha para mim. Gostaria de expressar toda minha gratidão e amor, pela pessoa maravilhosa que você é. **Ao meu pai e a minha vó Hortência**, por terem se dedicado exaustivamente a me tornar a pessoa que eu sou hoje, e por serem um exemplo pra mim. Nunca conseguirei expressar o amor, admiração e orgulho que sinto por vocês. Tudo que eu faço eu devo a vocês e aos meus irmãos, **Henrique e Camilla**.

Ao Frederico Gleber Netto por ser o meu companheiro de vida e de profissão. Por todo amor e dedicação que você tem pelo nosso relacionamento. Obrigada pelos inúmeros finais de semana tirados para me ajudar, pelo apoio, pelo desejo de crescer profissionalmente e pessoalmente ao seu lado.

À Dra. Adriane Graicer Pelosof por ter contribuído para a minha formação científica nesta jornada, por ter me proporcionado várias oportunidades de trabalho. Além de sempre ter me tratado muito bem.

Ao Dr. Felipe Coimbra e Dr. Helano Freitas por terem me recebido algumas vezes em suas salas para me sanarem algumas dúvidas, muitas vezes repetidas. Por terem contribuído com meu crescimento científico.

Aos amigos do laboratório de Genômica Médica, em especial à Dra. Maria Galli, por desde o início ter ajudado no meu crescimento profissional e por ter se tornado uma amiga muito especial. Um agradecimento especial à **Dra. Ana Flávia Costa** por todas as coisas que já fez por mim neste percurso e pela amizade que criamos, além de ter me ajudado várias vezes cientificamente. À **Msc Sheila Garcia** pela ajuda e amizade criada. Também aos amigos **Mariana Serpa, Emílio Tarcitano, Marina Eloi e Andrew Thomas**.

À **enfermeira de pesquisa Lais Senda** pela ajuda nas coletas e por ter se tornado uma pessoa especial.

À **equipe da endoscopia** por todo auxílio nas coleta e por terem me tratado com muito respeito e carinho.

À **equipe de Bioinformática coordenada pelo Dr. Israel Silva**, e especialmente ao **Renan Valieris** por toda ajuda e explicações.

À **Dra Maria Dirlei Begnami** pelo auxílio nos questionamentos referentes à análise patológica e por ter revisado todas as nossas lâminas.

À **equipe do Biobanco, em especial ao Dr. Hugo Campos, Eloisa Olivieri e Ana Paula Mitsue**, por todo auxílio no processamento das amostras.

Ao Laboratório de Gênômica e Biologia Molecular, pela ajuda com o desenvolvimento deste trabalho. **Em especial Dra. Dirce Carraro, Dra. Bruna Barros, Dra. Cláudia de Paula e Dra. Elisa Napolitano**, pela ajuda no crescimento técnico e científico.

Aos amigos que ficarão guardados, em especial Bruna Barros, Beatriz Schiavon, Felipe Ilelis, Fernanda, Flávia, Isabella, Kivvi. Vocês fizeram o meu mestrado muito mais feliz. Cada um de vocês tem um espaço em meu coração de uma maneira única. E também a todos os amigos que fiz no CIPE pelos momentos divertidos compartilhados.

Aos funcionários da Pós-Graduação do A.C.Camargo Cancer Center e do CIPE, por sempre estarem dispostos a ajudar.

RESUMO

Pizzi MP. **Detecção de DNA tumoral em câncer gástrico e a avaliação de sua utilidade no contexto de biópsias líquidas.** São Paulo; 2016. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente]

Altas taxas de mortalidade são características dos adenocarcinomas gástricos (ADGs), especialmente pela ausência de sintomas específicos e pelos achados clínicos mais relevantes se manifestarem apenas na doença avançada. As biópsias que permitem o diagnóstico são coletadas a partir da lesão durante o exame endoscópico, mas nem sempre permitem uma adequada representação da heterogeneidade tumoral dos ADGs. Assim, a detecção de DNA tumoral em fluidos corporais é promissora por ter potencial de representar a carga mutacional tumoral de modo mais amplo. Neste trabalho usamos mutações em *TP53* como marcadores da presença de DNA tumoral, investigadas nas biópsias teciduais e em fluidos corporais: lavado gástrico (LG) coletado na endoscopia e plasma de 46 pacientes. Para todos os casos obtivemos as três amostras antes de qualquer tratamento, e para a maioria (31/46) obtivemos amostras também após o tratamento cirúrgico e/ou quimioterápico. Detectamos *TP53* mutado nas biópsias de 15/46 (32,6%) pacientes; essas mesmas mutações foram encontradas em LG para 7/13 (53,9%) casos e no plasma em 6/15 (40%) casos. No LG encontramos 4 mutações ausentes na biópsia, sugerindo heterogeneidade tumoral. A análise combinada de LG e plasma permitiu a detecção de DNA tumoral em 9/15 (60%) casos. Ao ampliarmos o número de genes avaliados, conseguimos observar mais mutações marcadoras, reforçando o valor de ampliar esta abordagem. Embora mais estudos sejam necessários, nossos dados indicam que o LG é relevante na detecção de mutação em ADGs e que o monitoramento de mutações pode ter valor em análises de prognóstico e resposta ao tratamento.

SUMMARY

Pizzi MP. **[Detection of tumor DNA in gastric cancer and evaluation of its usefulness in the context of liquid biopsies]**. São Paulo; 2016. [Dissertação de Mestrado- Fundação Antônio Prudente]

High mortality rates are characteristic of gastric adenocarcinomas (GAC), especially due to late diagnosis, since the most relevant symptoms and clinical findings manifest only in advanced disease. Diagnosis is made by incisional biopsy, collected during endoscopy exam. Although this procedure may allow diagnosis in the majority of the cases, it may be inadequate for characterization of tumor genetic heterogeneity. Therefore, tumor DNA detection in body fluids would be a promising approach to characterize tumor mutational load comprehensively. In this work, we used *TP53* mutations, found in GAC biopsies, as markers for the presence of tumor DNA in body fluids, represented by gastric washes (GW), collected in endoscopy exam, and plasma of 46 patients. Tumor biopsy, GW and plasma were collected from these 46 patients prior to any treatment, and also after surgery and/or chemotherapy for most of them (31/46). We detected *TP53* mutations in 15/46 (32.6%) biopsies; 7 out 13 (53.9%) patients showed the correspondent *TP53* mutation in GW and 6 out 15 (40%) cases in plasma. Four *TP53* mutations were detected in GW but were absent in tumor biopsy, suggesting tumor heterogeneity. Combining mutation detection results from GW and plasma allowed the detection of tumor DNA in 9 out of 15 (60%) cases. When we increased the number of genes evaluated, we observed more marker mutations, reinforcing the value of extending this approach. Although further study is needed, our data indicate that GW are relevant in mutation detection in GAC, which may be useful for monitoring the presence of mutations that may have prognostic value and determine response to treatment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Anatomia do estômago.....	1
Figura 2	Estadiamento TNM do CG.....	4
Figura 3	Subtipos do Adenocarcinoma gástrico.....	6
Figura 4	Estimativa da incidência do Câncer de estômago.....	8
Figura 5	Fatores de risco e de proteção que influenciam na carcinogênese gástrica	15
Figura 6	Ilustração sobre tipos de gastrectomia.....	17
Figura 7	Figura ilustrativa da hipótese da origem do DNA tumoral circulante.....	31
Figura 8	Ilustração esquemática da PCR em emulsão.....	46
Figura 9	Figura ilustrativa do controle de qualidade da ePCR.....	47
Figura 10	Enriquecimento da biblioteca amplificada por ePCR.....	47
Figura 11	Química do sequenciamento na plataforma Ion Proton.....	48
Figura 12	Teste de fragmentação das amostras de LG e biópsia tumoral.....	50
Figura 13	Integridade do DNA nas amostras utilizadas no painel customizado.....	51

Figura 14	Perfil das amostras no Bioanalyzer após a fragmentação no Covaris.....	52
Figura 15	Perfil no Bioanalyzer após o termino da construção das bibliotecas.....	54
Figura 16	Química do sequenciamento na plataforma Illumina.....	55
Figura 17	Filtro da bioinformática pelo ruído de trocas de bases específicas no LG.....	61
Figura 18	Filtro da bioinformática pelo ruído no contexto de trinucleotídeos no LG.....	62
Figura 19	Filtro da bioinformática pelo ruído de variação posicional distribuídos por todo o gene.....	65
Figura 20	Curvas de sobrevida Kaplan-Meier no contexto dos subtipo histológico, sexo e presença de metástase.....	72
Figura 21	Resultados gerais do sequenciamento.....	73
Figura 22	Mutações distribuídas nos domínios da proteína TP53.....	80
Figura 23	Diagrama de Venn das mutações compartilhadas entre os dois subtipos histológicos.....	81
Figura 24	Perfil mutacional de troca de nucleotídeos em <i>TP53</i> para cada um dos dois subtipos principais de CG.....	82
Figura 25	Diagrama de Veen das mutações detectadas no LG e plasma.....	100

Figura 26	Diagrama de Veen apresentando o compartilhamento entre as mutações distintas(únicas) detectadas no LG, plasma e tumor.....	101
Figura 27	Correlação entre tumor e LG, tumor e plasma.....	102
Figura 28	Dinâmica das mutações pré e pós tratamento.....	104
Figura 29	Concentração de DNA total nas amostras de LG e PL.....	111
Figura 30	Correlação entre as frequências das mutações em <i>TP53</i> nas duas plataformas de sequenciamento aplicadas.....	114
Figura 31	Genes mais frequentemente mutados do painel de captura, por subtipo tumoral.....	114

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1	Frequência de mutação em <i>TP53</i> nos diferentes subtipos de ADGs, em diferentes estudos.....	28
Tabela 2	Valores estatísticos para o filtro de ruído de trocas de bases específicas para todos os tipos de amostra.....	60
Tabela 3	Valores estatísticos para o filtro no contexto da posição gênômica para todos os tipos de amostra.....	63
Tabela 4	Médias da cobertura vertical e <i>on-target</i> de todas as amostra sequenciadas neste estudo.....	74
Tabela 5	Mutações em <i>TP53</i> encontradas nas biópsias de tumor aqui avaliadas.....	77
Tabela 6	Mutações observadas em biópsia e/ou no LG indicado nos dois tipos de amostra para os pacientes.....	87
Tabela 7	Mutações de <i>TP53</i> encontradas no plasma.....	93
Tabela 8	Mutações encontradas no LG e plasma.....	99
Tabela 9	Descrição das mutações em <i>TP53</i> em todos os pacientes, antes e depois do tratamento, incluindo as mutações filtradas.....	105
Tabela 10	Frequências das mutações encontradas no sequenciamento feito pelo sistema AmpliSeq e no Painel customizado por captura.....	113

Quadro 1	Genes avaliados no painel customizado sintetizado pela empresa Agilent.....	49
Quadro 2	Dados clínico-patológicos dos pacientes recrutados.....	68
Quadro 3	Características das mutações em TP53 encontradas nas biópsias tumorais.....	79
Quadro 4	Potencial impacto das mutações encontradas apenas no LG.....	90
Quadro 5	Descrição das mutações em TP53 por tipo de amostra...	99

LISTA DE ABREVIATURAS

ACRG	<i>Asian Cancer Research Group</i>
ADGs	Adenocarcinoma gástrico
AID	Citidina desaminase induzida por ativação
CDH1	Proteína de adesão celular da E-caderina
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CG	Câncer gástrico
CNVs	Variação no número de cópias
CTC	Célula tumoral circulante
ctDNA	DNA tumoral circulante
CTLA-4	Linfócito T citotóxico associado a proteína 4
DCF	Docetaxel, Cisplatina e 5-FU
DIN	Integridade do DNA
EBV	Vírus <i>Epstein barr</i>
EC	Estadiamento Clínico
ECF	Epirubicin, Cisplatina e 5-Fluorouracila
EP	Estadiamento Patológico
ePCR	PCR em emulsão
EOX	Epirubicin
EUS	Ultrassonografia endoscópica
FAP	Polipose adenomatosa familiar
FM/UFMG	Faculdade de Medicina/Universidade Federal de Minas Gerais
Her2/ERBB2	Receptor do fator de crescimento epidermal 2
Hp	<i>Helicobacter pylori</i>
HDGC	Câncer gástrico hereditário de tipo difuso
HNPCC	Síndrome hereditária de câncer de cólon não-polipóide
IGV	<i>Iterative Genomics Viewer</i>
INCA	Instituto Nacional do Câncer
ISPs	<i>Ion Spheres Particles</i>

L	lavado gástrico
LG	lavado gástrico
M	Doença metastática à distância
ml	Mililitro
mmHg	Milímetro de mercúrio
n	Número
N	Linfonodo
ng	Nanograma
nt	Nucleotídeo
pb	Pares de bases
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction- Reação em cadeia da polimerase</i>
pM	Pico-molar
PL	Plasma
qPCR	<i>PCR</i> quantitativo
QT	Quimioterapia
QT-neo	Quimioterapia neoadjuvante
R	Coefficiente de correlação
T	Tamanho do tumor primário
T	Biópsia tumoral
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
tDNA	DNA tumoral
TGI	Trato gastrointestinal
TVC	<i>Torrent Variant Caller</i>

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Câncer gástrico	1
1.2	Classificação patológica de Lauren	5
1.3	Aspectos epidemiológicos	7
1.4	Etiologia.....	10
1.5	Aspectos clínicos e terapêuticos do ADG.....	16
1.6	Aspectos genéticos do ADG.....	20
1.7	<i>TP53</i> em câncer gástrico.....	25
1.8	A importância de Biópsias Líquidas no CG	28
2	OBJETIVOS	35
2.1	Objetivo Geral.....	35
2.2	Objetivos Específicos	35
3	MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1	Seleção dos pacientes	37
3.2	Coletas das amostras de LG	38
3.3	Coleta de sangue	38
3.4	Extração do DNA.....	39
3.4.1	Extração de DNA de tecidos.....	39
3.4.2	Extração do DNA circulante obtido do plasma	40
3.4.3	Extração do DNA a partir do LG	41
3.5	Sequenciamento em larga escala de <i>TP53</i>	43
3.5.1	Construção das bibliotecas.....	43
3.6	PCR em emulsão	45
3.6.1	Controle de qualidade da emulsão e enriquecimento.....	46
3.7	Sequenciamento de <i>TP53</i>	48
3.8	Painel customizado	49
3.9	Sequenciamento do painel customizado	54

4	ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA	56
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
5.1	Características clínico-patológicas das amostras sequenciadas.....	67
5.2	Resultados do sequenciamento do painel de <i>TP53</i>	73
5.3	Mutações em <i>TP53</i> no tumor	74
5.4	Busca de mutações em <i>TP53</i> no LG.....	84
5.5	Análise de mutações em <i>TP53</i> encontradas no plasma.....	92
5.6	Análise comparativa das mutações encontradas	98
5.7	Análise das mutações dos pacientes após tratamento.....	103
5.8	Painel gênico customizado	112
6	CONCLUSÕES	119
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	120

ANEXOS

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

Anexo 2 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aplicado aos
pacientes

Anexo 3 Iniciadores utilizados para a construção das bibliotecas do
AmpliSeq

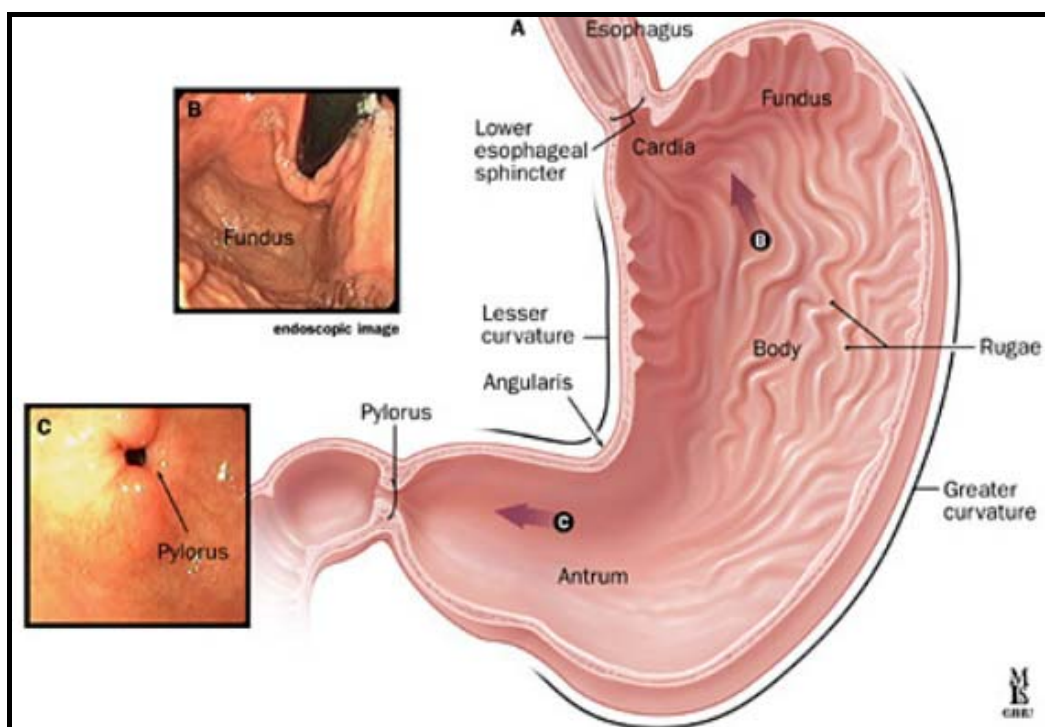
Anexo 4 Valores estatísticos para o filtro de ruído de variação
posicional, para todos os tipos de amostras

Anexo 5 Tabela com informações sobre frequência mutacional e
concentração de DNA total para cada paciente, antes e após
o tratamento

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER GÁSTRICO

O câncer gástrico (CG) pode acometer todo o estômago, desde a junção gastresofágica até o piloro (NAGINI 2012) (**Figura 1**). Cerca de 95% dos casos de CG são classificados como adenocarcinomas (ADGs), tumores malignos que surgem a partir de tecido epitelial glandular. Outros tipos de câncer gástrico são tumores neuroendócrinos, estromais, e linfomas.



Fonte: <http://www.hopkins-gi.org/>

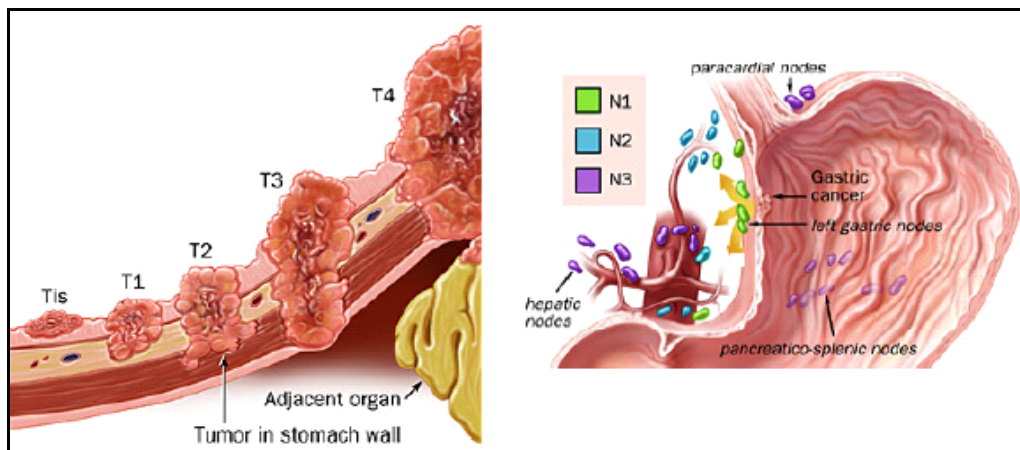
Figura 1 - Anatomia do estômago. (A) Ilustração esquemática da anatomia do estômago, as fotos em destaque mostram as regiões do fundo (B) e piloro (C)

A localização do tumor tem implicações importantes no tratamento e prognóstico do CG. Estudos têm demonstrado que as neoplasias localizadas no terço proximal do estômago representam entidades clínicas distintas (GORE 1997; ADACHI et al. 2000; BORCH et al. 2000; MSIKA et al. 2000; YOKOTA et al. 2000). Corroborando esta hipótese, alguns autores sugeriram que tumores proximais (nas regiões da cárdia, fundo e junção gastresofágica) têm maior probabilidade de serem maiores, infiltrativos, com invasão venosa e linfonodal, e com pior sobrevida global em relação aos tumores distais (no antro, corpo, incisura angular e piloro) (PINTO-DE-SOUSA et al. 2001; WERNER et al. 2001).

Normalmente, o CG inicial não causa nenhum sintoma característico, entretanto alguns pacientes podem ter sintomas gastrointestinais inespecíficos como a dispepsia, caracterizada pelo desconforto abdominal após alguma refeição. Já os sintomas para a doença avançada incluem dor abdominal persistente, disfagia (dificuldade de deglutir), dispepsia, saciedade precoce e anemia por deficiência de ferro. Tumores ulcerados podem levar a um sangramento, que se manifesta na forma de melena, hematêmese (vômitos com sangue) e até mesmo fortes hemorragias. Aqueles que obstruem a luz do trato gastrointestinal podem causar vômitos ao se alimentar. Os sintomas sistêmicos como anorexia e perda de peso podem sugerir uma doença avançada (HAMILTON e AALTONEN 2000; WADDELL et al. 2013). A ausência de sintomas específicos têm como consequência a busca por auxílio médico quando a doença já encontra-se em quadro avançado, sendo esta uma das razões da baixa sobrevida

(NAGINI 2012).

O exame físico para detecção do CG precoce é geralmente pouco informativo; pacientes com doença avançada podem apresentar uma massa abdominal palpável, caquexia, obstrução da luz do trato gastrointestinal, ascite, hepatomegalia e edema (GRABSCH e TAN 2013; DICKEN et al. 2005). Em geral o diagnóstico é feito por exame de imagem endoscópica associado a análise histopatológica das biópsias. A combinação desses e de outros exames revelam informações indispensáveis para o tratamento do paciente. A endoscopia é considerada o método diagnóstico mais sensível e específico em pacientes com suspeita de CG (KARPEH e BRENNAN 1998) pois, além de fornecer a biópsia de lesões suspeitas, permite a visualização direta do tumor, informando sua localização, extensão e o grau de acometimento da mucosa (SADOWSKI e RABENECK 1997). Quando combinado com exames de imagens e ultrassonografia endoscópica (EUS), a endoscopia pode detalhar o estadiamento, fornecendo informações sobre a profundidade de invasão tumoral e grau de comprometimento linfonodal (MARTIN-RICHARD et al. 2015). O estadiamento do CG é estabelecido através do sistema TNM, que utiliza dados relacionados ao tamanho do tumor e profundidade da infiltração (T), acometimento linfonodal (N) e presença de metástases (M) (**Figura 2**).



Fonte: <http://www.hopkins-gi.org/>

Figura 2 - Estadiamento TNM do câncer gástrico. (T) tamanho do tumor, (N) comprometimento linfonodal. (M1) A presença de lesão metastática à distância

A histopatologia do CG é heterogênea. Os ADGs podem se apresentar formando estruturas glandulares tubulares, acinares ou papilares. Ou também uma complexa mistura de células isoladas e pouco coesas com morfologias variáveis, por vezes em combinação com estruturas glandulares, trabeculares, ou estruturas alveolares sólidas (CARNEIRO et al. 1997). Vários sistemas de classificação foram propostos, tendo como base as características microscópicas, assim como descrito por LAUREN (1965), MING (1977), Organização Mundial da Saúde (HAMILTON e AALTONEN 2000), NAKAMURA et al. (1968), MULLIGAN (1972), GOSEKI et al. (1992), CARNEIRO et al. (1997), e também a classificação japonesa (KANDA e KODERA 2015). No ocidente, as classificações mais utilizadas são baseadas no sistema da OMS e a classificação de Lauren.

Além da heterogeneidade patológica, esse aspecto também prevalece no cenário molecular, onde há o acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas. Assim, a identificação de alterações moleculares nas principais

vias de desenvolvimento e progressão tumoral pode ter importantes implicações terapêuticas, tendo o potencial de apontar alterações mais relevantes em um contexto de uma abordagem terapêutica de precisão (DENG et al. 2012; WADDELL et al. 2013).

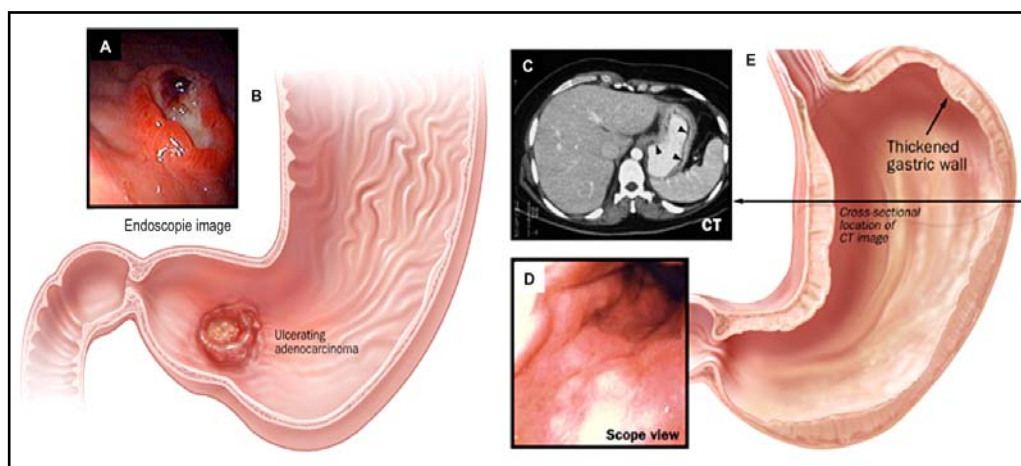
1.2 CLASSIFICAÇÃO PATOLÓGICA DE LAUREN

A classificação histopatológica proposta por Lauren (LAUREN, 1965), usada como padrão nesta dissertação, é uma das mais clássicas e mais frequentemente adotadas no estudo dos ADGs. Ela tem como base o padrão histológico e de crescimento (GORE 1997) e os agrupa em dois subtipos principais:

(1) Intestinal: em geral não apresentam componente hereditário e são caracterizados pela formação de estruturas glandulares moderadamente ou bem diferenciadas, com células coesas e de padrão colunar semelhantes às células do epitélio intestinal. ADGs do tipo intestinal apresentam padrão de crescimento expansivo, ao invés de infiltrativo (DICKEN et al. 2005; GORE 1997) e geralmente ocorrem na porção distal do estômago (SAIKAWA et al. 2010);

(2) Difuso: possuem pouca ou nenhuma formação glandular, em geral acometem indivíduos mais jovens e possuem um componente hereditário mais importante. Estes tumores são caracterizados por células neoplásicas dispersas, ou em pequenos grupos, que infiltram a mucosa gástrica levando ao seu espessamento e aumento da rigidez. As células tumorais podem ter

muco e formato de anéis de sinete. ADGs do tipo difuso possuem pior prognóstico e podem ocorrer em qualquer localização do estômago (SAIKAWA et al. 2010) (**Figura 3**). Outros tipos tumorais são considerados indeterminados, com alterações discretas e sem enquadramento nas características descritas, além dos subtipos mistos, que possuem características de ambos os subtipos difuso e intestinal (POLK D BRENT 2010; GRABSCH e TAN 2013).



Fonte: <http://www.hopkins-gi.org/>

Figura 3 - Subtipos do adenocarcinoma gástrico. A e B) Carcinoma gástrico do tipo intestinal. A) Achado endoscópico e B) Ilustração esquemática correspondente. C-E) Carcinoma gástrico do tipo difuso. C) Tomografia computadorizada com setas indicando os locais de espessamento da parede estomacal. D) Achado endoscópico e E) Ilustração esquemática

ADGs-difusos e ADGs-intestinais possuem características clínicas e patológicas distintas. O subtipo intestinal cresce mais superficialmente, é significativamente maior em tamanho antes de romper a superfície serosa, e tem uma maior incidência de invasão venosa e metástases para o fígado e pulmões. O subtipo difuso propaga-se mais através dos vasos linfáticos para

a pleura e peritônio e em geral apresenta pior prognóstico (GRABSCH e TAN 2013).



1.3 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

Os tumores do trato gastrointestinal (TGI), incluindo esôfago, estômago, fígado, cólon e pâncreas, são responsáveis por cerca de 1,5 milhões de novos casos e mais de 1,25 milhões de mortes a cada ano. Acredita-se que a frequência das neoplasias do TGI varie de acordo com as regiões geográficas, devido a variações regionais na dieta, estilo de vida, e infecções bacterianas ou virais e possivelmente aspectos étnicos e diversidade genética populacional (ABEDI-ARDEKANI e HAINAUT 2014).

O CG está entre as principais neoplasias malignas do mundo, ocupando a quarta posição em relação à incidência e a terceira em relação à mortalidade (COCCOLINI et al. 2016). Em todas as populações, o risco é cerca de 2 vezes maior no sexo masculino do que no feminino e o pico de incidência ocorre por volta da sétima década de vida (FUCCIO et al. 2010; WADDELL et al. 2013). A sobrevivência relativa após cinco anos de diagnóstico do CG é muito baixa em ambos os sexos: nos homens não ultrapassa 35%, e nas mulheres 15%, variando muito de acordo com o estágio da doença ao diagnóstico. Exceção se faz para o Japão, onde programas de rastreio aumentaram a taxa de sobrevivência em 5 anos até cerca de 60% em oposição à maioria das áreas do mundo onde apenas 20% dos pacientes atinge esta marca (PARKIN 2001; CUNNINGHAM et al. 2005; ROUKOS e KAPPAS

2005). É possível que o prognóstico ruim se deva principalmente ao diagnóstico frequente em estágio avançado, que restringe as opções de tratamento. Dessa forma, para reduzir a mortalidade é essencial investir em diagnóstico precoce e no desenvolvimento de abordagens terapêuticas mais eficientes.

No Brasil, para o ano de 2016, estima-se a ocorrência de 20.520 novos casos de CG, sendo 12.920 para homens e 7.600 para mulheres, segundo estimativa do INCA (www.inca.gov.br) (Figura 4). Independente da região do país, homens, idosos e indivíduos de classes sociais menos favorecidas são os mais afetados (ZILBERSTEIN et al. 2013).

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

Fonte: Ministério da Saúde (2016)

Figura 4 - Estimativa da incidência do câncer de estômago.

Nos países em desenvolvimento e em grupos menos favorecidos sócio-economicamente o CG na porção distal do estômago é predominante, tendo a dieta e *H. pylori* (Hp) como maiores fatores de risco. Já os CG proximais são mais comuns em países desenvolvidos, e têm como principais fatores de risco o refluxo gastroesofágico e a obesidade (CREW e NEUGUT 2006; NAGINI 2012).

A diminuição global de incidência do CG nas últimas décadas pode ser vista principalmente para o subtipo intestinal, associado com a diminuição da prevalência de infecção por Hp (KONTUREK et al. 2006; VENERITO et al. 2014). Em contraste, a incidência do CG difuso tem aumentado na Ásia, Estados Unidos e Europa, sendo responsável por aproximadamente 40% dos casos de ADG (BAMBOAT et al. 2014; PERNOT et al. 2015). Se por um lado este aumento pode ser explicado pela tentativa mais recente de se reduzir a divergência entre as classificações patológicas usadas (PERNOT et al. 2015), não podemos descartar a possibilidade de uma alteração na epidemiologia da doença. De qualquer modo, o subtipo CG intestinal ainda predomina em áreas de alto risco, como a Ásia, Europa Oriental e América do Sul, enquanto que o subtipo difuso tem uma distribuição geográfica mais uniforme (HENSON et al. 2004; WADDELL et al. 2013).

Por fim, a distribuição geográfica do CG não pode ser atribuída somente às diferenças raciais. Já que, estudos mostram que pessoas que migram de zonas com elevada incidência, tais como o Japão, para regiões de baixa incidência, como os Estados Unidos, mostram menor risco de desenvolvimento da doença (GOLDSTEIN e HIRSCHHORN 2004; HOWE et al. 2006; NAGINI 2012).

1.4 ETIOLOGIA

O ADG possui origem multifatorial (**Figura 5**), sendo estes alguns dos fatores de risco mais conhecidos:

- Infecção por *Helicobacter pylori* - esta é uma bactéria gram-negativa, do grupo das proteobactérias, pertencente à família Helicobacteraceae. Hp é um importante agente etiológico que age em diversas etapas na carcinogênese do CG. A infecção pelo Hp é assintomática e pode estar associada com gastrite aguda ou crônica e presença de úlcera péptica (gástrica ou duodenal), podendo progredir para o carcinoma gástrico. As bactérias se alojam na parede da mucosa gástrica normal, especialmente no antro nas células produtoras de muco, podendo estar ausentes em lesões potencialmente malignas, sugerindo que sua influência possa ser exercida também à distância, por toxinas, resposta inflamatória e danos ao DNA. Certas cepas de Hp possuem um grupo de aproximadamente 30 genes nomeados como *ilhas Cag* de patogenicidade, que levam a um maior grau de inflamação e proliferação celular (KEATES et al. 1999; CARL-MCGRATH et al. 2007). Proteínas codificadas pelas *ilhas Cag* formam um sistema de secreção que podem transferir diretamente a proteína CagA para as células epiteliais, induzindo uma cascata de sinalização e de mudanças morfológicas (SEGAL et al. 1999; ASAH I et al. 2000; ODENBREIT et al. 2000; HIGASHI et al. 2002).

O Hp também pode produzir a citotoxina VacA, responsável por danos às células epiteliais. A VacA atravessa a membrana das células epiteliais, induzindo a formação de vacúolos que afetam as mitocôndrias e levam à apoptose (FUCCIO et al. 2010; KUCK et al. 2001). A proliferação celular em lesões positivas para Hp é maior, sugerindo seu papel como um fator mitótico no epitélio gástrico. Além disso, a potente atividade da urease liberada pelo patógeno culmina na liberação da amônia, que também favorece a replicação celular. Lesões Hp-positivas apresentam danos moleculares similares aos encontrados nos CGs, como metilação, baixa expressão de genes de reparo, quebras no DNA com indução de expressão aberrante da enzima citidina-desaminase no epitélio gástrico (HAMILTON e AALTONEN 2000; SERVETAS et al. 2016). Citidina desaminase induzida por ativação (AID), é uma enzima da família das citidina-desaminases que atua na edição de ácidos nucleicos. A expressão aumentada de AIDs é reconhecida como um modificador genômico que contribui para a tumorigênese (CASCALHO 2004). Outro estudo mostrou a relação da infecção por Hp e um aumento na expressão de AID e na frequência de mutação no gene supressor de tumor *TP53*, o gene mais frequentemente mutado em CG. Os autores demonstraram que pacientes com gastrite e câncer gástrico Hp-positivos apresentavam alta expressão desta enzima, levando a múltiplas mutações em *TP53*, e observaram também que pacientes não-infectados não expressavam AID no tecido gástrico (MATSUMOTO et al. 2007).

Além disso, Hp se liga ao antígeno Lewis do grupo sanguíneo, podendo ser mais um fator a favor da infecção crônica associado ao risco aumentado desta neoplasia, observada principalmente em pacientes pertencentes ao grupo sanguíneo A (NIV et al. 1996).

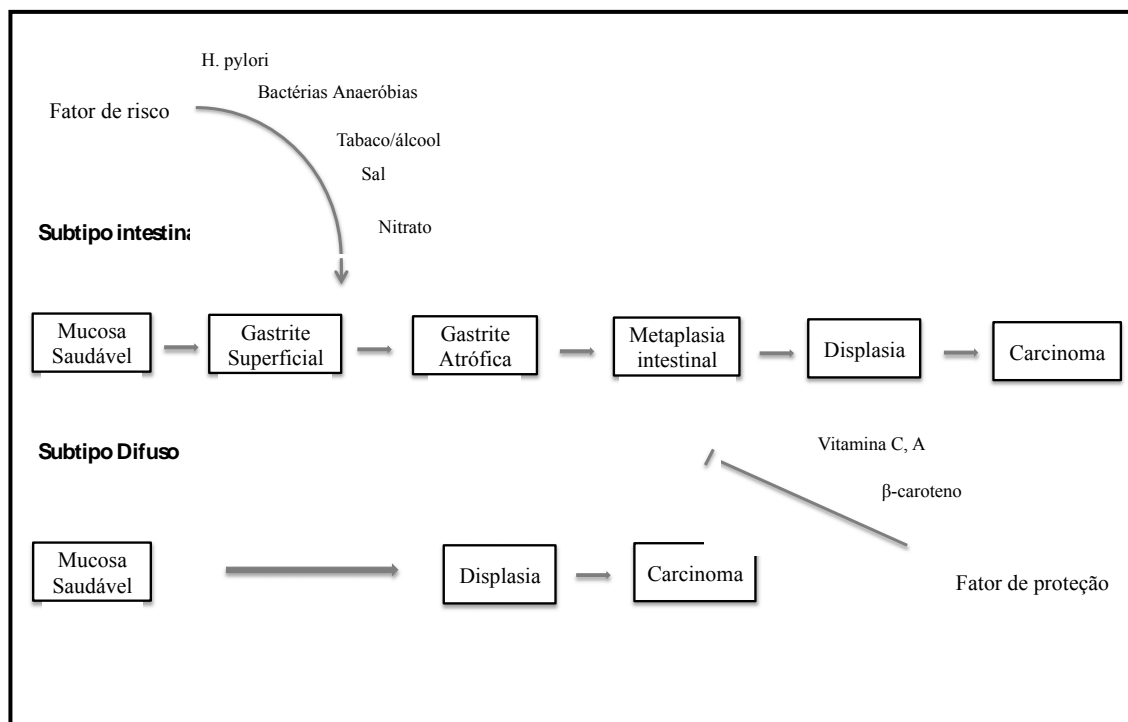
- Infecção pelo vírus Epstein-Bar (EBV) – Para uma parcela de 5-10% dos CGs existem evidências de um papel importante da infecção pelo vírus EBV (MORITANI et al. 1996; AKIBA et al. 2008; MURPHY et al. 2009; CHEN et al. 2015b). Essa infecção ocorre principalmente na região proximal do estômago, como a cárdia e fundo, e é mais prevalente em homens (MURPHY et al. 2009). Um estudo recente comparou a presença do EBV em indivíduos saudáveis e pacientes com lesões potencialmente malignas, como a metaplasia intestinal. Foi observado que todos os indivíduos saudáveis eram negativos para EBV e aproximadamente 50% dos pacientes com lesões gástricas eram EBV+ (RYAN et al. 2012; CHEN et al. 2015b). Assim como o Hp, o EBV é encontrado em ambos os subtipos tumorais (intestinal e difuso), (SHIBATA e WEISS 1992), porém, seu mecanismo carcinogênico ainda não é totalmente esclarecido (CARL-MCGRATH et al. 2007; JÁCOME et al. 2016).
- Dieta- Estudos epidemiológicos demonstraram a associação consistente entre tipos de dietas e diferentes subtipos tumorais, de modo especialmente importante para o subtipo intestinal (HAMILTON

e AALTONEN 2000). O consumo frequente de frutas, verduras e alimentos contendo ácido ascórbico e carotenóides parece reduzir o risco devido seus efeitos antioxidantes, enquanto a ingestão de cálcio e vitamina-A protege a mucosa gástrica, reduzindo a formação de componentes carcinogênicos derivados de grupos nitrosos (HUANG et al. 2000). O oposto ocorre com consumo excessivo de sal e produtos enlatados, sendo um forte fator de risco para o CG (DICKEN et al. 2005). Além da dieta, fatores como o uso de tabaco e álcool também tem forte associação com CG (DEN HOED e KUIPERS 2016).

- Fatores genéticos- A maioria dos CGs ocorre esporadicamente, enquanto aproximadamente 10% possuem um componente hereditário (MAGALHÃES QUEIROZ e LUZZA 2006; FUCCIO et al. 2010; YAGHOUBI et al. 2010). Mutações germinativas em *TP53* (síndrome de Li-Fraumeni) e *BRCA2* predispõem ao desenvolvimento desta neoplasia (DICKEN et al. 2005). Além dessas, mutações germinativas no gene que codifica a proteína de adesão celular da E-caderina (*CDH1*) levam a uma predisposição autossômica dominante para o CG difuso hereditário, com penetrância ao redor de 70% (HUNTSMAN et al. 2001). Algumas síndromes familiares de predisposição ao câncer incluem o CG como um componente significativo. Essas síndromes incluem a síndrome hereditária de câncer de cólon não-polipóide (HNPCC), a polipose adenomatosa familiar e a síndrome de Peutz-Jeghers (GIARDIELLO et al. 1987;

OFFERHAUS et al. 1992; WATSON e LYNCH 1993; LYNCH e SMYRK 1996).

- Doenças predisponentes ao CG- A ocorrência de doenças prévias tais como gastrite e gastrite crônica atrófica, que alteram a secreção ácida e elevam o pH estomacal, podem causar significativas mudanças na microbiota gástrica, favorecendo o crescimento de bactérias anaeróbias. Essas bactérias produzem moléculas redutoras que transformam o nitrato em nitrito, sendo esta última uma molécula capaz de reagir com aminas, amidos e uréia, gerando componentes nitrosos com funções cancerígenas (HAMILTON e AALTONEN 2000). Outras condições clínicas associadas incluem metaplasia intestinal da mucosa gástrica, pólipos adenomatosos do estômago, anemia perniciosa e cirurgia gástrica prévia com refluxo biliar. Além de baixa condição socioeconômica e obesidade (CREW e NEUGUT 2006; FUCCIO et al. 2010; TRAMACERE et al. 2012).



Fonte: Adaptado a partir de CARL-MCGRATH et al. (2007).

Figura 5 - Fatores de risco e de proteção que influenciam na carcinogênese gástrica

Como demonstrado na **Figura 5**, a persistência da gastrite leva ao surgimento da gastrite atrófica e metaplasia intestinal. A atrofia da mucosa é caracterizada pela perda de elementos glandulares e substituição por células metaplásicas ou fibrose, podendo causar baixa secreção de ácido clorídrico. Metaplasia é uma lesão potencialmente maligna caracterizada pela transformação da mucosa gástrica em um fenótipo semelhante ao intestino, contendo células caliciformes e mucinas intestinais (TAN e YEOH 2015). A cronificação da gastrite atrófica e da metaplasia intestinal pode culminar com o aparecimento da displasia. Um importante aspecto é o acúmulo de lesões na mucosa gástrica, tanto pelo aspecto patológico, como pelo quadro de

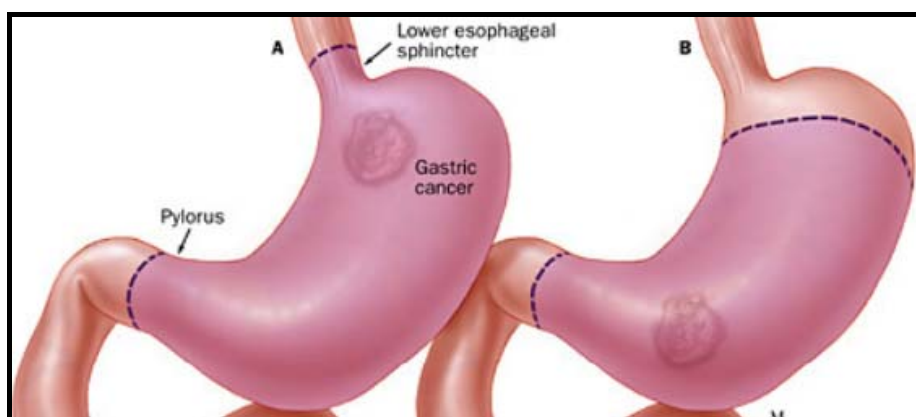
inflamação (TAN e YEOH 2015). A displasia é caracterizada por extensa atipia celular e estrutural, definida também sob o termo de neoplasia intraepitelial, que pode progredir ao desenvolvimento do carcinoma invasivo. Essa sequência proposta inicialmente por Correa (CORREA 1992) é mais associada com o subtipo intestinal, sendo este mais influenciado pelo ambiente, progredindo concomitantemente com acúmulos de alterações genéticas.

Opondo-se ao subtipo intestinal, o subtipo difuso é menos influenciado por fatores ambientais, podendo iniciar a carcinogênese sem nenhuma lesão precursora e estando geralmente associado a um pior prognóstico (CORREA e CHEN 1994; DIKKEN et al. 2012; GRABSCH e TAN 2013; CĂINAP et al. 2015). Entretanto, ele está mais associado com obesidade e doença do refluxo gastroesofágico (JÁCOME et al. 2016). Além disso, a infecção pelo Hp é bem estabelecida para o subtipo intestinal, mas sua associação com o subtipo difuso é controversa. (PERNOT et al. 2015)

1.5 ASPECTOS CLÍNICOS E TERAPÊUTICOS DO ADG

Os ADGs não metastáticos em geral são tratados com cirurgia, que pode ser associada a quimioterapia e/ou radioterapia. A ressecção curativa tem indicação desde estágios iniciais onde a ressecção endoscópica pode ser empregada de acordo com o tamanho e grau de infiltração da lesão, presença de ulceração e subtipo histológico (GOTODA et al. 2010; ZHU et al. 2016). Para doença localmente avançada, a ressecção cirúrgica é o

“padrão-ouro” (COCCOLINI et al. 2016). Ela implica na remoção do tumor primário e de nódulos linfáticos regionais com margens livres de tumor. Em termos gerais, existem dois tipos de ressecções: gastrectomia subtotal e total (**Figura 6**), que são determinadas essencialmente de acordo com estadiamento TNM e a localização do tumor (MARTIN-RICHARD et al. 2015).



Fonte: <http://www.hopkins-gi.org/>

Figura 6 – Ilustração sobre tipos de gastrectomia. A) Gastrectomia Total-Tumores localizados na parte superior do estômago. Serão removidos nódulos linfáticos, partes do intestino delgado, esôfago, e tecidos adjacentes ao tumor. B) Gastrectomia Parcial (subtotal)- Tumores localizados na parte inferior do estômago. É removida parte do estômago acometido pelo tumor e partes adjacentes a ele.

Várias estratégias de QT/radioterapia têm sido avaliadas, mas nenhuma delas pode ser considerada padrão (COSTA JR et al. 2012). A quimioterapia neoadjuvante (QT-neo) é empregada com objetivo de reduzir a extensão do tumor e viabilizar cirurgia curativa e a QT hipertérmica intraperitoneal é empregada em algumas situações, como em casos de CG com citologia positiva no fluido peritoneal (11% a 27%) (KANO et al. 2015) e de forma adjuvante para pacientes com alto risco de recidiva peritoneal. Ambas

estratégias aumentam a sobrevida global quando comparadas com tratamento cirúrgico isolado (COCCOLINI et al. 2016). A conduta preferencial adotada no A.C.Camargo Cancer Center é a realização de quimioterapia perioperatória associada à cirurgia para pacientes com doença localizada ou localmente avançada. O esquema de quimioterapia pode envolver duas ou três drogas, com várias combinações tendo sido utilizadas ao longo dos últimos anos, como ECF, DCF, EOX e FOLFOX. Atualmente, o esquema de escolha para a maioria dos casos é FOLFOX.

Apesar de o desenvolvimento de terapias-alvo ter avançado nos últimos anos, a única disponível para CGs até o momento consiste nos anticorpos monoclonais contra HER-2/neu (ERBB2) para pacientes com aumento de expressão da proteína ou amplificação deste gene (COCCOLINI et al. 2016).

Além disso, ainda não existem marcadores de valor prognóstico ou que permitam diagnóstico precoce ou mesmo monitoramento de resposta ao tratamento nestes tumores (MARTIN-RICHARD et al. 2015). Neste cenário, o uso de imunoterapia que bloqueie o escape das células tumorais do sistema imune é uma estratégia atraente para o tratamento de CG. Assim, entender os mecanismos do sistema imune na vigilância tumoral pode fornecer recursos para o desenvolvimento de terapias que ativem a resposta contra as células tumorais (CHEN e MELLMAN 2013), o que estimulou o desenvolvimento de imunoterapia também para o CG. Dentre elas estão, vacinas terapêuticas que auxiliem as células T ao reconhecimento e combate aos antígenos tumorais (neoantígenos); o bloqueio de linfócitos T

citotóxicos associados a proteína 4 (CTLA-4) e a ligação de PD-1 e PD-L1 que são capazes de inibir a resposta dos linfócitos T (ALSINA et al. 2016). Sendo assim, várias pesquisas clínicas envolvendo imunoterapia têm sido feitas em CG (BOCKORNY e PECTASIDES 2016).

Marcadores tumorais ideais são indicadores relacionados a aspectos relevantes no manejo da doença, tais como presença da malignidade, prognóstico, recorrência e resposta ao tratamento. Tais marcadores podem ser encontrados em amostras tumorais, tecidos adjacentes, no sangue ou em outros fluídos corporais. No CG, os marcadores disponíveis são muito poucos e não podem ser considerados específicos (são encontrados também em outras patologias), nem suficientemente sensíveis (pois não são detectáveis em alguns pacientes) (CĂINAP et al. 2015). Os marcadores tumorais séricos utilizados no CG são: CEA, CA 72-4 e CA19-9, úteis principalmente para detecção de recorrência ou avaliação da resposta ao tratamento (SHIMADA et al. 2014). Porém, eles são utilizados para todo o trato gastrointestinal, podendo ou não aumentar nos diferentes pacientes, além de terem baixa sensibilidade e especificidade (STRONG et al. 2013; KIM et al. 2014; CĂINAP et al. 2015). CA19-9 e CA72-4 foi encontrada em aproximadamente 40% dos pacientes com CG avançado e inferior a 20% em pacientes com tumores iniciais (BEEHARRY et al. 2016).

1.6 ASPECTOS GENÉTICOS DO ADG

Acredita-se que o aparecimento do ADG surge após o acúmulo gradual de alterações genéticas e epigenéticas, que se traduzem em diferentes subtipos moleculares (ZAKY et al. 2008). Neste sentido, ambos os subtipos difuso e intestinal, além de apresentarem padrões histológicos e clínicos distintos, também possuem padrões moleculares característicos (YASUI et al. 2000; ZHENG et al. 2004).

CGs são um conjunto heterogêneo de neoplasias, com diferentes prognósticos, mesmo em estádios clínicos similares, e com respostas terapêuticas discrepantes (ASSUMPCAO et al. 2006; RODRÍGUEZ BURBANO et al. 2006; LIN et al. 2015a). As classificações histológicas de Lauren e da OMS utilizadas na rotina do diagnóstico dos ADGs não fornecem informações relevantes para a conduta clínica dos pacientes (CHOI et al. 2016). Além disso, classificações baseadas apenas na morfologia não conseguem distinguir diferentes subtipos moleculares, dificultando indicação de terapias-alvo (LIN et al. 2015). Entretanto, no cenário atual do CG, é importante definir novos alvos que possam levar a terapias mais efetivas.

Neste contexto, vários grupos têm se dedicado ao sequenciamento de genomas e exomas completos, ou mesmo ao sequenciamento de painéis gênicos abrangendo alterações que possam estar associadas ao CG e que possam ser traduzidas para um tratamento adequado. No entanto, nenhuma

classificação molecular com impacto clínico foi estabelecida até o momento (TAN e YEOH 2015).

Recentemente um estudo de 295 amostras, publicado pelo TCGA (*The Cancer Genome Atlas*), propôs uma classificação molecular dividindo o CG em 4 subtipos moleculares: 1) tumores positivos para o vírus do Epstein-Barr (9% das amostras), 2) tumores com alta instabilidade de microssatélites (22%), 3) tumores genomicamente estáveis (20%) e 4) tumores com instabilidade cromossômica (50%). Cada subtipo foi encontrado disperso por todo o estômago, entretanto os tumores com instabilidade cromossômica mostraram-se com elevada frequência na junção gastroesofágico/cárdia (65%), ao passo que a maioria dos tumores EBV-positivos estavam presentes na região gástrica proximal (62%) (BASS et al. 2014).

Os casos EBV-positivos se mostraram fortemente associados a mutações em *PIK3CA*, sendo 80% destas não-silenciosas (KANEDA et al. 2012; BASS et al. 2014; TAN e YEOH 2015). Essas mutações são encontradas mais dispersas em *PIK3CA* nos casos EBV-positivos, enquanto casos EBV-negativos apresentam mutações mais frequentes no exon 20 (BASS et al. 2014). Além disso, casos EBV-positivos carregam mutações no gene *ARID1A* em 55% dos casos e raras mutações em *TP53*. Ademais, apresentam alta prevalência de hipermetilação no DNA, em comparação com outros subtipos, que parecem estar associados a uma resposta à infecção (KANEDA et al. 2012; BASS et al. 2014; CHOI et al. 2016).

O subgrupo com alta instabilidade de microssatélites foi relacionado com perda da atividade em genes de reparo ao DNA, sendo correlacionado

com idade mais avançada, sexo feminino, subtipo intestinal e tumores menos agressivos (AN et al. 2012; BASS et al. 2014; CHOI et al. 2014, 2016; LIM et al. 2016). Estes tumores apresentam mais mutações por megabases comparados com todos os outros subtipos, sendo chamados de hipermutados (CHOI et al. 2016; LIM et al. 2016). Suas mutações são mais frequentes por substituição de C/T, enquanto que outros subtipos moleculares exibiram enriquecimento de uma assinatura de troca de A/C (LIU et al. 2014; WANG et al. 2014). A incidência desse subgrupo no ADG variou de 8,5-37,8% (CHOI et al. 2014) e este tem sido descrito como tendo o melhor prognóstico e menor taxa de recorrência (CRISTESCU et al. 2015). É importante ressaltar que para este subgrupo, estudos mostram que o prognóstico independe do uso de quimioterapia adjuvante (ZHANG et al. 2015; AN et al. 2012; KIM et al. 2015).

Tumores genomicamente estáveis são mais frequentes entre aqueles do subtipo difuso; possuem menor carga mutacional em comparação com outros subtipos e ocorrem em uma idade relativamente menor (BASS et al. 2014; CHOI et al. 2016; LIM et al. 2016). Como este subtipo é geralmente mais agressivo e invasivo, sua rápida progressão pode resultar em um diagnóstico em idade precoce e acredita-se que haja menos tempo para acúmulo de mutações, como observado em outros subtipos (LIM et al. 2016). Seu aspecto infiltrativo torna difícil a obtenção de amostras puras, resultando assim numa baixa eficiência na detecção de mutações. Portanto, a classificação do subtipo “genomicamente-estável” pode ser consequência de um baixo percentual de células tumorais e os dados genômicas de tumores

do tipo difuso ainda devem ser vistos com cautela (LIM et al. 2016). Mutações em *RHOA* são mais frequentes nos tumores difusos (6,5 a 25,3%) e nestes também têm sido relatado o encontro de fusões envolvendo os genes *CLDN18* e *ARHGAP6* ou *ARHGAP26* (BASS et al. 2014; KAKIUCHI et al. 2014; WANG et al. 2014). Um estudo recente correlacionou estas fusões com a transição epitélio-mesênquima, podendo favorecer o caráter infiltrativo e de pior prognóstico deste tumor (YAO et al. 2015). Além disso, *RHOA* tem papel no controle da contratilidade e motilidade celular (RIDLEY et al. 2003; THUMKEO et al. 2013), o que faz com que mutações neste gene contribuam para um crescimento tumoral com padrão de dispersão celular (BASS et al. 2014), também associado a um pior prognóstico. Ademais, mutações em *RHOA* não foram encontradas em tumores do subtipo intestinal (BASS et al. 2014), e estas têm sido sugeridas como promissoras candidatas a novas abordagens terapêuticas do CG de subtipo difuso (TAN e YEOH 2015). Outra alteração somática encontrada no subtipo difuso é no gene *CDH1*, presente em 30 a 37% dos casos (BASS et al. 2014; CHOI et al. 2016; KAKIUCHI et al. 2014), sendo que alterações estruturais neste gene foram relacionados com pior prognóstico (CORSO et al. 2013).

Por fim temos ainda os tumores com instabilidade cromossômica, classificados com base no grau de aneuploidia, com prevalência do subtipo intestinal, mutações frequentes em *TP53* e amplificação de genes codificadores de receptores de tirosina-quinase (BASS et al. 2014; LIM et al. 2016). A ocorrência de alterações genômicas globais e cariótipos complexos são frequentes nos ADGs (BEGNAMI et al. 2012).

Além da heterogeneidade tumoral temos ainda que lidar com a diversificada heterogeneidade de classificações patológicas e moleculares propostas. Isso mostra a necessidade de maior maturação da área e dificulta a obtenção de um consenso e consequente padronização de abordagens terapêuticas e de terapias-alvo.

Em 2015 o grupo asiático de pesquisa em câncer (*Asian Cancer Research Group, ACRG*) propôs outra classificação molecular baseada em seus resultados dividindo os casos em 4 subgrupos: i) *mesenchymal-like*, que inclui tumores do subtipo difuso com um pior prognóstico e maior taxa de recorrência (63%); ii) tumores com instabilidade de microssatélites, de maior frequência no subtipo intestinal, hipermutados, ocorrendo principalmente no antro, com melhor prognóstico e menor frequência de recorrência (22%); iii) Grupo com proteína p53 ativa, com melhor prognóstico; iv) p53 inativo, com taxa de recorrência e prognóstico intermediário (em relação aos grupos i e ii), o que reforça a importância de *TP53* na tumorigênese dos ADG.

É importante ressaltar que a casuística predominantemente asiática que esse grupo utilizou, diferente do TCGA, que possui uma casuística mais heterogênea. No entanto, a validação dos achados nas amostras do TCGA, sugere a robustez desta classificação (CRISTESCU et al. 2015). Ainda, sabemos que vários outros genes têm uma frequência relativamente elevada de mutações em ADGs. Os mesmos foram compilados nesta dissertação em um painel gênico que é apresentado na **Tabela 2** (sessão 3.8) (BASS et al. 2014; KAKIUCHI et al. 2014; WANG et al. 2014).

A importância da identificação destas mutações e o desenvolvimento de tratamentos específicos para o CG, além de biomarcadores capazes de diagnosticar e/ou monitorar o curso clínico destes pacientes é de suma importância quando comparamos com o cenário atual dos pacientes com amplificação de *HER2*. A adoção desta terapia específica anti-HER2 levou a um aumento na taxa de resposta ao tratamento, aumentando a sobrevida global destes pacientes (SHODA et al. 2016). Em vista disso, várias alterações genéticas já foram descritas, e algumas destas validadas e reconhecidas como alvos promissores para testes clínicos. Assim, diversos ensaios clínicos estão em fase avançada, incluindo alguns que avaliam a eficácia de tratamentos com Cetuximab, Lapatinib, Tremelimumab, AZD1480, Olaparib, Rilotumumab e pembrolizumab (ZHANG et al. 2015; JCOME et al. 2016) e outros.

Desta maneira, talvez o paradigma terapêutico atinja sua plenitude quando for voltado para um tratamento preciso e personalizado com base em perfis de alterações moleculares, patológicas e clínicas observadas em cada indivíduo (LIN et al. 2015).

1.7 TP53 EM CÂNCER GÁSTRICO

A inativação da proteína TP53 é uma característica marcante na carcinogênese humana. Mais da metade de todos os tumores possui mutações em *TP53*, tornando-o o gene mais mutado em vários tipos de câncer (AUBREY et al. 2016). Este gene se localiza no cromossomo 17

humano, possui 11 exons e 10 introns e é traduzido em uma proteína de 53kDa, com 393 aminoácidos (SADEGHI et al. 2013; BANIAK et al. 2016)

TP53 se liga ao DNA, onde regula a transcrição (ZAIKA et al. 2015). Sendo um gene supressor tumoral TP53 é essencial para prevenir a proliferação celular aberrante e manter a integridade e estabilidade do genoma (BRUSA et al. 2003; BRUECKL et al. 2004; SADEGHI et al. 2013). TP53 é um componente chave em diversos mecanismos celulares que controlam a resposta celular a vários estresses celulares, incluindo danos no DNA, ativação de oncogenes, perda de inibição de crescimento por contatos célula-célula, privação de nutrientes como hipóxia, produção anormal de espécies reativas de oxigênio e outros, sendo por isso é reconhecido como o guardião do genoma (ANANIEV et al. 2011; ZAIKA et al. 2015). Uma vez ativado, TP53 regula processos tais como a apoptose, proliferação, senescência e quiescência celular. Estes processos estão fortemente associados a múltiplas vias envolvidas na regulação do metabolismo e da homeostase celular, sendo estes mecanismos complexos e ainda não totalmente compreendidos.

Mutações em *TP53* são comuns em ADGs, sendo detectadas em 40 à 70% dos casos (HANAONO et al. 2006; BASS et al. 2014; KAKIUCHI et al. 2014; WANG et al. 2014). O subgrupo com instabilidade cromossômica, segundo dados do TCGA, possui altos índices de mutação de *TP53* (71%) (BASS et al. 2014). Estas mutações têm sido extensivamente estudadas em diversos tipos de tumores, onde se investigou seu papel no diagnóstico, monitoramento e terapêutica destas neoplasias. No ADG, tais mutações têm

um papel importante nos estádios iniciais da carcinogênese e são encontradas até mesmo em lesões tidas como potencialmente malignas, como a metaplasia intestinal. Sugere-se que o número de mutações se acumule com a progressão da doença (HAMELIN et al. 1994; BUSUTTIL et al. 2014), corroborando a hipótese que mutações no *TP53* são de grande importância em ADGs. As mutações, além de afetar a função de TP53 como supressor tumoral, também podem gerar uma proteína mutante com ganho de função, o que pode contribuir ativamente para várias fases da progressão tumoral, incluindo surgimento de metástases à distância e maior resistência a antineoplásicos (SIGAL e ROTTER 2000; PEART e PRIVES 2006; PETITJEAN et al. 2007; XU et al. 2014).

A função de TP53 como um potente fator de transcrição, com papel fundamental na manutenção da estabilidade celular é bem estabelecida (BELYI et al. 2010; BELLINI et al. 2012) e seu amplo espectro mutacional em ADGs foi confirmado, usando abordagens em larga-escala, tanto no subtipo intestinal, quanto no subtipo difuso (PEDDANNA et al. 1995; LEE et al. 2012, 2014; LIANG e KIM 2013; BASS et al. 2014; KAKIUCHI et al. 2014; WANG et al. 2014; WONG et al. 2014). Entretanto, mutações em *TP53* parecem ser mais prevalentes no subtipo intestinal (BUSUTTIL et al. 2014; XU et al. 2014), estando também associadas a altos níveis de variações no número de cópias (CNVs) - tanto a nível gênico, quanto de regiões cromossômicas (LEI et al. 2013; TAN e YEOH 2015) - corroborando o fato de que mutações em *TP53* podem causar instabilidade cromossômica (SCHWARTZ et al. 2001; CIRIELLO et al. 2013; SIEREN et al. 2014).

Em vista disso, estudos relataram que a taxa de sobrevida em cinco anos para pacientes com *TP53* mutado é menor se comparada a pacientes sem mutação, podendo sugerir que estas mutações possam de fato contribuir para um pior curso clínico da doença (LIM et al. 1996; IRELAND et al. 2000). Desta forma, de maneira concisa, a **Tabela 1**, mostra a frequência de mutações em *TP53* para os diferentes subtipos de ADG, deixando clara a variação entre os diferentes trabalhos.

Tabela 1 - Frequência de mutação em *TP53* nos diferentes subtipos de ADGs, em diferentes estudos.

Fonte	Intestinal	Difuso	Misto
(KOHNO et al. 2016a)	5%	36,4%	-
(TAHARA et al. 2014)	44%	26,9%	58,3%
(CRISTESCU et al. 2015)	54,2%	39,3%	6,5%
(HANAZONO et al. 2006)	29,4%	5,8%	11,8%
(KAKIUCHI et al. 2014)	43%	34%	-
(XU et al. 2014)	12,6%	7,4%	-
(ALI et al. 2015)	33,3%	29,1%	-
(WANG et al. 2014)	38%	25,4%	21,7%
Média	32,4%	25,5%	24,6%

1.8 A IMPORTÂNCIA DE BIÓPSIAS LÍQUIDAS NO CG

No atual cenário oncológico, biomarcadores são utilizados em situações clínicas diversas tais como diagnóstico, tratamento, monitoramento da resposta ao tratamento e recidiva. Biomarcadores de prognóstico se baseiam em características biológicas ou clínicas, que podem ser medidas e fornecem informações sobre a resposta dos pacientes em

relação a progressão da doença (ITALIANO 2011). Em medicina de precisão, estes biomarcadores podem permitir a seleção de pacientes com base no risco de recorrência da doença ou podem apontar pacientes com maior risco de progressão. Biomarcadores terapêuticos servem como indicadores de resposta ao tratamento, permitindo assim uma seleção cuidadosa de abordagens com maior chance de resposta ou menores efeitos colaterais (OLDENHUIS et al. 2008; ZHANG et al. 2015). Considerando as limitadas opções de tratamento para o CG e a sua alta mortalidade, biomarcadores prognósticos e preditivos poderiam trazer informações indispensáveis para o tratamento, melhorando a qualidade de vida e a sobrevida dos pacientes.

Muitos estudos sugerem que o DNA tumoral circulante (ctDNA) pode ser uma alternativa como biomarcador na detecção precoce das neoplasias, para prever o prognóstico, a eficácia terapêutica e recidiva tumoral (DE MATTOS-ARRUDA et al. 2011; SCHWARZENBACH e HOON e PANTEL 2011; KIM et al. 2014; FANG et al. 2016). Eles proporcionam uma oportunidade única para monitoramento da dinâmica tumoral de forma não-invasiva, conhecida como biópsia líquida (ESPOSITO et al. 2014).

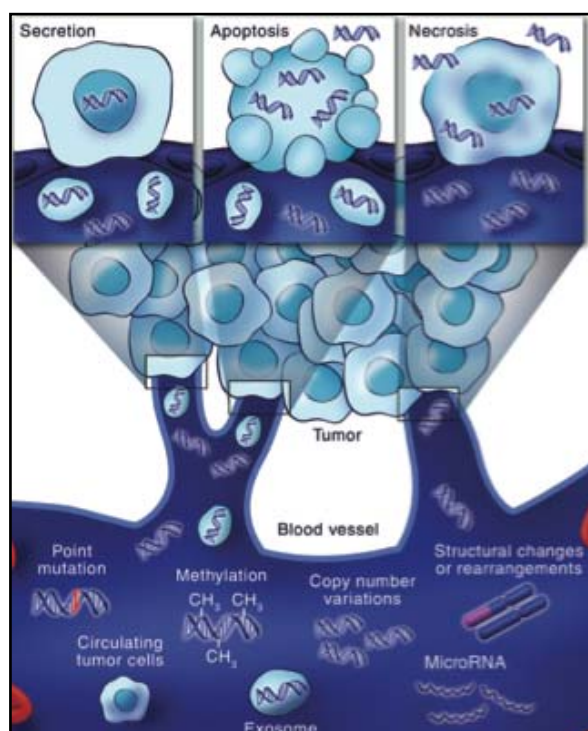
A apoptose e necrose das células tumorais no microambiente tumoral são provavelmente a causa da liberação dos ácidos nucleicos no sangue. Os macrófagos normalmente digerem células apoptóticas e necróticas, e, em seguida, liberam o DNA para o ambiente do tecido (STROUN et al. 2000a; ESPOSITO et al. 2014;). Outra hipótese é que o ctDNA se origine da lise de células tumorais circulantes (CTC), ou micro-metástases (ESPOSITO et al.

2014; STROUN et al. 2000b). No entanto, parece haver uma grande lacuna entre a maior quantidade de DNA livre na circulação em relação às raras CTC normalmente encontradas (TSUJIURA et al. 2014).

Acredita-se também que o tumor possa liberar DNA ativamente para a corrente sanguínea (SCHWARZENBACH et al. 2011b). Embora essa secreção permaneça enigmática, uma possível explicação seria que as células tumorais liberam ácidos nucleicos para transformar as células receptoras à distância (TREJO-BECERRIL et al. 2012; TSUJIURA et al. 2014). A **Figura 7** ilustra as diferentes hipóteses da origem de ctDNA.

O ctDNA é altamente fragmentado, com tamanho médio entre 70 e 200 pares de bases (JAHR et al. 2001), e meia-vida variando de alguns minutos a poucas horas (SCHWARZENBACH et al. 2011b). DNA livre presente na circulação sanguínea também pode ser encontrado em indivíduos saudáveis (BEEHARRY et al. 2016) e é ligeiramente mais propenso a aumentar durante a gravidez ou em casos de trauma, septicemia, embolia pulmonar, enfarte do miocárdio e doenças sistêmicas tais como o lúpus (CUI et al. 2013b; LUI e DENNIS 2002). No entanto, em alguns pacientes oncológicos o DNA livre é encontrado aumentado de 2 a 3 vezes, podendo variar de acordo com o tipo do tumor (LEON et al. 1977; DE MATTOS-ARRUDA et al. 2011). Além disso, o DNA detectado na circulação de pacientes oncológicos parece exibir as mesmas características biológicas do DNA tumoral, sugerindo que a origem sua origem seja a partir de células tumorais, enquanto em sujeitos saudáveis o DNA é principalmente derivado de células do sangue (BEEHARRY et al. 2016). Além disso, já foi

demonstrado que pacientes com pólipos no colón e neoplasia benigna no colón possuem maiores massa de DNA circulante que controles, sugerindo sua validade no monitoramento da carcinogênese desde eventos precoces (MEAD et al. 2011). DIEHL et al. (2005) estimaram que 3,3% do DNA de um tumor colorretal de 100 gramas, é liberado na circulação a cada dia.



Fonte: DIAZ e BARDELLI (2014).

Figura 7 - Figura ilustrativa da hipótese de origem do DNA tumoral circulante

Dessa forma, em teoria, mutações tumorais podem ser utilizadas no rastreamento e diagnóstico da doença através de amostras de sangue. No entanto, métodos de detecção com elevada sensibilidade são essenciais, já que a proporção de ctDNA pode ser muito pequena e variada, de acordo com localização, tipo e estágio tumoral (PHILIPP et al. 2014). Além disso, diferentes métodos de detecção têm sido publicados, utilizando diferentes

tipos de amostras, diferentes tipos de metodologias de extração de DNA e análise dos dados, o que torna difícil a comparação dos resultados (DIEHL et al. 2008; KIM et al. 2014).

Uma aplicação mais realista para o uso do ctDNA seria seu monitoramento durante o tratamento, como um marcador da resposta terapêutica e recidiva tumoral, possibilitando assim o monitoramento personalizado da resposta (ANDERSEN et al. 2015). As amostras de sangue poderiam substituir as inúmeras biópsias de tecido realizadas, que são invasivas, caras e em geral não representam de modo abrangente a heterogeneidade intra-tumoral (DIAZ e BARDELLI 2014; NANNINI et al. 2014; ANDERSEN et al. 2015).

Em 2012, KIM demonstraram que pacientes com gastrite erosiva, gastrite atrófica e metaplasia intestinal, tinham quantidades de DNA livre no plasma significativamente maiores do que controles. Além disso, OYAMA et al, mostrou pela primeira vez a detecção do domínio extracelular de HER2 das células tumorais no soro, sendo este, um eficiente método de monitoramento em pacientes com CG (OYAMA et al. 2015; SHIMADA 2015).

A detecção do gene *MYC* amplificado também foi observada com maior frequência na circulação de pacientes com CG comparado a controles, tendo uma boa correlação com o tecido tumoral e com o método FISH (PARK et al. 2009). Por fim, HAMAKAWA e seus colaboradores mostraram que concentrações de ctDNA no plasma de pacientes com CG exibiram uma boa correlação com a dinâmica tumoral. Eles observaram que níveis de ctDNA caíam após a cirurgia, e aumentavam quando o paciente apresentava recidiva ou tinha doença residual. Indicando sua potencial aplicação para

acompanhar o status do CG (HAMAKAWA et al. 2014). Esta dinâmica também foi vista em câncer colorretal, tendo aumento nos níveis de ctDNA antes que as lesões se tornassem visíveis nos exames de imagem (DIEHL et al. 2008).

Sendo assim, mesmo sendo um área de pesquisa promissora, ela também é desafiadora, já que a quantidade de ctDNA corresponde aproximadamente a apenas 1% de todo o DNA livre encontrado na circulação. Entretanto, suas aplicações já estão sendo bem estabelecidas e comprovadas (DIAZ e BARDELLI 2014).

Poucos estudos foram realizados com câncer gástrico, e ainda se faz necessário examinar a possibilidade de que ctDNA mutado possa ser usado para o monitoramento da progressão da doença e da resposta durante as diferentes fases do tratamento. Além disso, biomarcadores poderiam ter um impacto importante na diminuição do alto índice de mortalidade em CG, permitindo um diagnóstico mais precoce, além da detecção de doença residual mínima e da disseminação peritoneal (HAMAKAWA et al. 2014).

A presença de DNA tumoral (tDNA) não é restrita às amostras de sangue, pois este pode ser encontrado em outros fluídos corporais, incluindo urina (CASADIO et al. 2013), saliva (NUNES et al. 2000; WEI et al. 2014), fluído cefalorraquidiano (PAN et al. 2015) e fluído peritoneal (SOH et al. 2006). Isso pode ser explicado pela maior concentração do tDNA em fluídos próximos a lesão neoplásica e que apresentam menor volume global em relação ao sangue, levando a sua menor diluição (PATEL e TSUI 2015). De modo análogo, em uma comparação entre fluído cefalorraquidiano e plasma, em pacientes com tumores cerebrais foi encontrada maior sensibilidade de

detecção de tDNA no primeiro (DE MATTOS-ARRUDA et al. 2015). O mesmo foi visto em fluido cístico de pacientes com câncer de ovário (WANG et al. 2016). Neste sentido, especulamos aqui se a utilização do lavado gástrico (LG) na busca de tDNA poderia ter valor no estudo do CG.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a presença de DNA tumoral, identificado inicialmente através de mutações em *TP53* na biópsia, em fluídos corporais de portadores de adenocarcinomas gástrico primário, avaliando sua utilidade em um contexto de biópsias líquidas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Buscar mutações em *TP53* nos adenocarcinomas gástricos.
- Para cada paciente com biópsia positiva para mutação em *TP53*, buscar as mesmas alterações também no DNA obtido a partir do LG, coletado durante procedimento endoscópico antes e depois do tratamento quimioterápico neoadjuvante e/ou pós-cirúrgico.
- Buscar as mesmas alterações presentes no tumor primário, também no DNA livre circulante presente no plasma, antes e depois do tratamento quimioterápico neoadjuvante e/ou pós-cirúrgico.
- Comparar LG e plasma, quanto ao seu valor na detecção de DNA tumoral, conforme tipo de tumor e seu estadiamento.

- Construir e utilizar um painel gênico customizado buscando um grupo de genes que permitam identificar o DNA tumoral mutado em um alto percentual de pacientes.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 SELEÇÃO DOS PACIENTES

Este foi um estudo prospectivo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas do A.C.Camargo Cancer Center, número 1975/14 (**Anexo 1**).

Os pacientes foram provenientes do setor de endoscopia do A.C.Camargo Cancer Center ou do Depto de Gastroenterologia da FM/UFMG, selecionados conforme a seguir:

Critérios de inclusão – Pacientes de ambos os sexos, com idade superior a 30 anos, diagnosticados com adenocarcinoma gástrico do tipo intestinal ou do tipo difuso, determinado pelo exame anatomo-patológico de biópsia. Os pacientes não poderiam ter passado por qualquer tratamento prévio relacionado a doença e não poderiam ter história oncológica diagnosticada anteriormente. Todos os pacientes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (**Anexo 2**).

Critérios de exclusão – Pacientes com síndromes de câncer familiar que predispõe ao desenvolvimento do CG, tais como a síndrome hereditária de câncer de cólon não-polipóide (HNPCC), a polipose adenomatosa familiar (FAP), a síndrome de Peutz-Jeghers e o câncer gástrico hereditário de tipo difuso (HDGC) foram excluídos do estudo. Os participantes não poderiam ser portadores de doenças mentais, ou possuir dificuldades de entendimento dos procedimentos necessários.

3.2 COLETA DAS AMOSTRAS DE LG

As amostras de LG foram coletadas no setor de endoscopia do A.C.Camargo Cancer Center em colaboração com a Dra. Adriane Pelosof Graicer, ou no Departamento de Gastroenterologia da UFMG (Dr. Luiz Gonzaga Vaz Coelho). Tal material tem um volume variável (entre 3 a 50 mL), e geralmente é descartado após o procedimento endoscópico. Neste estudo estas amostras foram coletadas após o consentimento do paciente e imediatamente processadas para medição e neutralização do pH, sendo armazenadas em freezer a -20 °C.

3.3 COLETA DE SANGUE

Foram coletados 15 ml de sangue dos pacientes, em tubos BD contendo ácido cítrico, citrato e dextrose (solução ACD) (GYÖRGY et al. 2014). Após a coleta os tubos foram armazenados à temperatura ambiente por no máximo duas horas e o plasma foi separado por centrifugação (2x) a 2500xg por 15 min, à temperatura ambiente. O plasma foi separado em alíquotas de 2ml e congelado a -80°C até sua utilização. As células restantes (hemácias e leucócitos) foram diluídas em 40 ml de solução Tris- EDTA 1X (pH= 8), agitadas em aparelho vórtex por 2 minutos a fim de lisar as hemácias e feita uma centrifugação a 3500 rpm por 7 min. Essa etapa foi realizada, no mínimo, duas vezes até se obter um *pellet* limpo contendo

apenas os leucócitos. Os leucócitos contidos nos tubos Eppendorf de 1,5 ml foram imersos em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C.

3.4 EXTRAÇÃO DO DNA

3.4.1 Extração de DNA de tecidos

Para a extração do DNA de tecido utilizamos até 30 mg de tecido congelado, sendo que todas as lâminas foram previamente revisadas de acordo com os critérios de Lauren (LAUREN 1965) no Departamento de Patologia do A.C.Camargo Cancer Center em colaboração com a Dra. Maria Dirlei Begnami. Quando possível, as amostras foram macrodissecadas para se obter uma maior quantidade de células tumorais e o percentual de células tumorais em cada amostra usada foi registrado. O DNA obtido a partir das biópsias foi extraído pelo kit *QIAamp DNA Mini Kit* (Qiagen, EUA), que se baseia na adsorção do DNA em membrana de sílica, sendo posteriormente eluído em água ou solução fornecida pelo kit. A integridade do DNA foi avaliada em gel de agarose 0,8% corado por SYBR® Safe DNA gel stain (Thermo Fisher Scientific, EUA). Para as amostras em que não foi possível obter tecido fresco, usamos amostras de blocos parafinados obtidas do Banco de Tumores do A.C.Camargo Cancer Center. Este DNA foi extraído pelo kit *QIAamp DNA FFPE Tissue Kit* (Qiagen, EUA), que também se baseia no mesmo princípio de adsorção do DNA à membrana de sílica. Porém, ele é preparado para lisar as células de uma forma especial com incubação em alta temperatura após digestão parcial com proteinase K,

conseguindo remover ou diminuir as ligações cruzadas entre a formalina e o DNA. Além disso, permite a liberação do DNA do tecido de modo a diminuir a co-extração de inibidores causados por ligação cruzada de formalina aos ácidos nucleicos.

3.4.2 Extração do DNA circulante obtido do plasma

Utilizamos o kit *QIAamp Circulating Nucleic Acid kit* (Qiagen, EUA) que se mostrou dentre vários outros kits, um dos mais eficientes para esta finalidade (MAUGER et al. 2015). A extração foi realizada no Hospital Sírio Libanês, com o apoio do grupo da Dra. Anamaria Aranha Camargo.

Utilizamos um volume de plasma que variou de 2 a 5 ml; amostras cujo volume de plasma foi inferior a 5 ml foram completadas com PBS para o mesmo volume final. Inicialmente adicionamos 500 µl de proteinase K (20 µg/µl) para lise de eventuais aglomerados proteicos ou células contaminantes. A seguir, adicionamos 4 ml do tampão ACL (contendo 1 µg de RNA-carreador). Este carreador aumenta a ligação de ácidos nucleicos à membrana durante a extração e reduz a possibilidade de degradação do RNA na rara possibilidade em que a RNase não seja desnaturada pelos sais e detergentes disponíveis no tampão ACL. A seguir, as amostras foram agitadas em aparelho vórtex por 30 segundos a fim de se obter uma mistura homogênea e estas foram incubadas a 60°C por 30 minutos. Em seguida, 9 ml do tampão ACB foram adicionados ao produto lisado, que foi novamente agitado por 30 segundos, e incubado no gelo por 5 minutos. As amostras foram então adicionadas às colunas conectadas ao sistema a vácuo com

uma pressão de aproximadamente 700 mmHg (Qiagen, EUA). Após a primeira filtragem, foram adicionados 600 µl do buffer ACW1 à coluna, filtrado, seguido da adição e filtragem de 750 µl do buffer ACW2 à coluna e mais uma última etapa de filtragem com 750 µl de etanol (100%). As colunas foram então colocada em tubos coletores de 2 ml e centrifugados em velocidade máxima (20,000 g) por 3 minutos. O tubos coletores foram trocados e com a tampa aberta as colunas foram incubadas a 56°C por 10 minutos para a completa secagem do etanol. Finalmente 40 µl do buffer AVE foi adicionado para eluição do DNA, e centrifugado na velocidade máxima por um minuto.

3.4.3 Extração de DNA a partir do LG

Após padronização inicial, onde alguns métodos foram testados para a extração do DNA presente nos lavados gástricos (LG), optamos pela utilização do método clássico para desproteinização e purificação do DNA: a extração por fenol-clorofórmio. O fenol desnatura as proteínas juntamente com o clorofórmio, que aumentando a estabilidade da interface entre solvente e fase aquosa. As proteínas desnaturadas formam uma camada na interface, separando-se do DNA.

Na extração, 1 ml das amostras foi misturado a 500 µl do tampão do kit *Cell Lysis Solution* (Gentra Puregene Blood Kit – Qiagen, EUA), acrescido de 15 µl de proteinase K (20 µg/µl, Invitrogen, EUA) para lise de qualquer célula ainda intacta e digestão das proteínas a 55°C sob agitação (300 rpm) por 1 hora. Posteriormente, foi adicionado ao lisado 500 µl da mistura de

Fenol-Clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1), homogeneizado e centrifugado por 10 min a 13.200 rpm à temperatura ambiente. Este passo foi repetido mais uma vez e o sobrenadante foi cuidadosamente coletado após a centrifugação. Posteriormente, foi adicionado 500 μ l de clorofórmio ao sobrenadante que foi homogeneizado e centrifugado nas mesmas condições já descritas. O DNA foi precipitado da fase aquosa por adição de 800 μ l de EtOH 100 % gelado e incubado por 1 hora a -20°C . Após centrifugação a 14000 rpm por 30 min o *pellet* obtido após a retirada do sobrenadante foi lavado duas vezes com 1 ml de EtOH 70% gelado e novamente centrifugado por 5 min a 14.000 rpm, a 4°C . A maioria dos solutos inorgânicos e moléculas orgânicas pequenas são solúveis em etanol 70%, assim a lavagem do precipitado com etanol 70% dessaliniza o DNA de forma eficiente. O *pellet* foi ressuscitado em 50 μ l de TE (Tampão Tris-EDTA) 1X pH 8,0 e armazenado a -20°C . A concentração do DNA obtido foi determinada através do kit *Qubit® 2.0 Fluorometer* e do *Qubit® dsDNA HS Assay* (Thermo Fisher, EUA), enquanto que sua integridade foi avaliada em eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com SYBR® Safe DNA gel stain (Thermo Fisher Scientific, EUA).

3.5 SEQUENCIAMENTO EM LARGA ESCALA DE *TP53*

3.5.1 Construção das bibliotecas

1. *Amplificação do gene alvo (TP53)*

Para a construção das bibliotecas do painel de *TP53* construímos bibliotecas alvo-específicas com o *Ion AmpliSeq™ Library kit 2.0* (Thermo Fisher, EUA) seguindo as etapas descritas abaixo. Para isto, usamos 20 ng de DNA em volume final de 6 μ l. Para cada amostra, usamos dois *pools* contendo 12 pares de oligonucleotídeos, de modo a cobrir todo o gene com 24 pares de iniciadores em duas reações distintas (vide **ANEXO 3**). O volume final da reação foi dividido em dois, um para cada *pool* de iniciadores, e adicionados 2 μ l de *5X Ion AmpliSeq HiFi Mix*, 5 μ l de *2X Ion AmpliSeq Primer Pool* em cada. O programa usado na amplificação do gene foi: 99°C por 2 minutos, seguido de 21 ciclos a 99°C por 15 segundos e 60°C por 4 minutos.

2. *Digestão parcial dos iniciadores, ligação dos adaptadores e purificação*

Ao produto amplificado, adicionamos 2 μ l da enzima FuPa (Thermo Fisher, EUA) para a digestão de iniciadores que não foram ligados ao DNA e retornamos as amostras ao termociclador com a seguinte programação: 50°C por 10 minutos, 55°C por 10 minutos e 60°C por 20 minutos. A seguir, adicionamos os *barcodes*, sequências de 10 nucleotídeos que permitem a identificação posterior das amostras durante a análise bioinformática. Para

tal, os *barcodes* são diluídos 1:4 em solução que contém 2 μ l do *Ion P1 Adapter*, 2 μ l do *Ion XpressTM Barcode X* e 4 μ l de água livre de nucleases (todos os reagentes da Thermo Fisher, EUA). Logo após, adicionamos 4 μ l da *Switch Solution*; 2 μ l das soluções diluídas dos *barcodes* e 2 μ l de *DNA ligase* e incubamos a 22°C por 30 minutos e 72°C por 10 minutos.

A etapa de purificação foi realizada com o reagente *Agencourt® AMPure® XP*, composto por esferas magnéticas (*beads*) que se ligam somente ao DNA, eliminando tampões e enzimas da solução. Dessa forma, adicionamos 45 μ l deste reagente que foi incubado à temperatura ambiente por 5 minutos, em seguida o sobrenadante foi descartado após colocação na estante magnética. As esferas foram então lavadas duas vezes com álcool 70% em estante magnética.

3. Quantificação da biblioteca amplificada com o Qubit® 2.0 Fluorometer

Aqui, as bibliotecas foram amplificadas novamente para obtenção de *amplicons* suficientes para a quantificação. Para a PCR usamos 50 μ l do reagente *Platinum PCR SuperMix High Fidelity* (Life Technologies, EUA) e 2 μ l do reagente *Library Amplification Primer Mix* (Life Technologies, EUA) em cada amostra. As reações foram feitas em termociclador com a seguinte programação: 98°C por 2 minutos, 5 ciclos a 98°C por 15 segundos e 64°C por 1 minuto.

Os produtos obtidos foram purificados 2 vezes com as *AMPure® XP beads* (Life Technologies, EUA), como descrito, e as bibliotecas foram

quantificadas tanto no aparelho *Qubit* e por PCR quantitativo em tempo real (qPCR) com o *Ion Library Quantitation Kit* (Life Technologies, EUA). Esse kit utiliza DNA genômico de *E.coli* para gerar uma curva padrão para a reação, que será utilizada para o cálculo da concentração das bibliotecas. A curva é feita em triplicata para cada diluição, e as amostras são avaliadas com no mínimo duas diluições.

3.6 PCR EM EMULSÃO (ePCR)

A ePCR tem como objetivo a amplificação clonal da biblioteca em pequenas esferas (também chamadas de *beads* ou de *Ion Spheres Particle*, ISP). Para iniciar a ePCR calculamos um fator de diluição tendo como base a quantificação determinada na qPCR. A reação ocorre em uma micela, formada por uma mistura composta de mesmo volume de água e óleo que contém todos os reagentes necessários para a PCR. As condições de diluição e centrifugação favorecem a entrada de apenas uma molécula de DNA por micela. Para iniciar a ePCR, cada uma das bibliotecas foi diluída para 100 pM, usando o equipamento *OneTouch 2* e ao final do processo é possível recuperar somente as esferas magnéticas com a biblioteca enriquecida, separada das micelas. O DNA amplificável nas micelas possui adaptadores em suas extremidades: em uma ponta fica o adaptador P1 que se liga à sequência complementar existente nas esferas, e do outro lado, na ponta livre o adaptador A, possibilitando assim a amplificação (**Figura 8**).

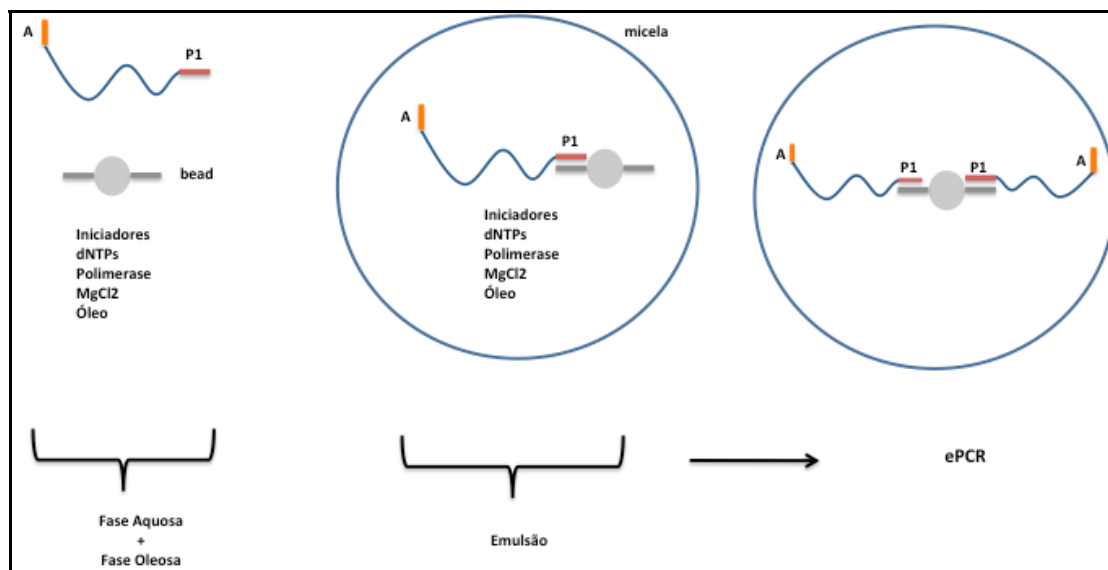


Figura 8 - Ilustração esquemática da PCR em emulsão.

3.6.1 Controle de Qualidade da Emulsão e Enriquecimento

Um controle de qualidade é realizado ao fim da ePCR, permitindo dosar as esferas que contenham os produtos de interesse, a fim de que o experimento siga para a próxima etapa apenas se a ePCR tiver sido eficiente. Esse controle é possível através da utilização de sondas que se ligam especificamente aos adaptadores e emitem fluorescência. Conforme ilustrado na **Figura 9**, a sonda que se liga ao adaptador A (aquele que está no ponta livre do fragmento de DNA) emite fluorescência a 647 nm. A sonda que se liga ao oligo B, uma porção presente na esfera magnética que é complementar ao adaptador P1, fluoresce a 488 nm. A fluorescência é lida no equipamento Qubit 2.0 (Life Technologies, California, EUA) e a relação do sinal das duas indica quantas esferas (*ISPs*) estão ligadas à biblioteca amplificada e quantas estão vazias. É recomendado que entre 10 a 25% das esferas contenham a biblioteca.

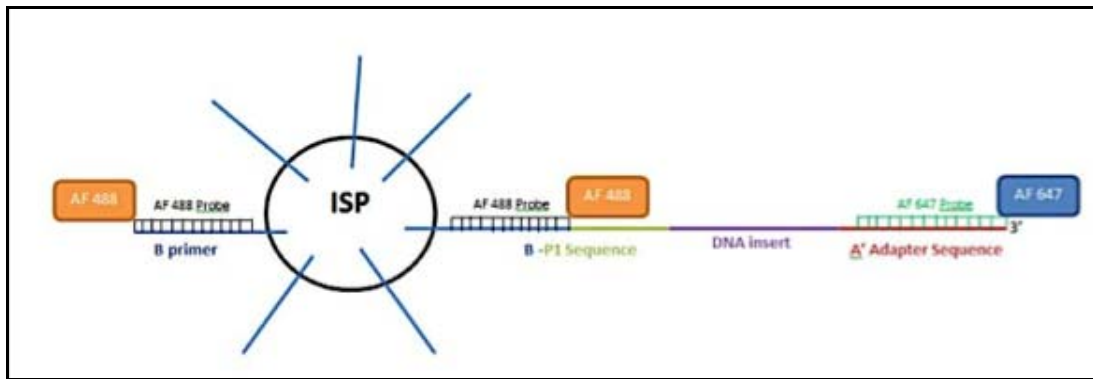


Figura 9 - Figura ilustrativa do controle de qualidade da ePCR.

Após a ePCR enriquecemos as amostras com as esferas que contêm as bibliotecas incorporadas, usando adaptadores biotinizados e esferas magnéticas com estreptavidina. Nesta etapa as moléculas de DNA biotinizadas ficam retidas no tubo, com auxílio de estante magnética, o DNA é então desnaturado com NaOH e após lavagem, apenas as fitas simples de DNA permanecem aderidas (**Figura 10**).

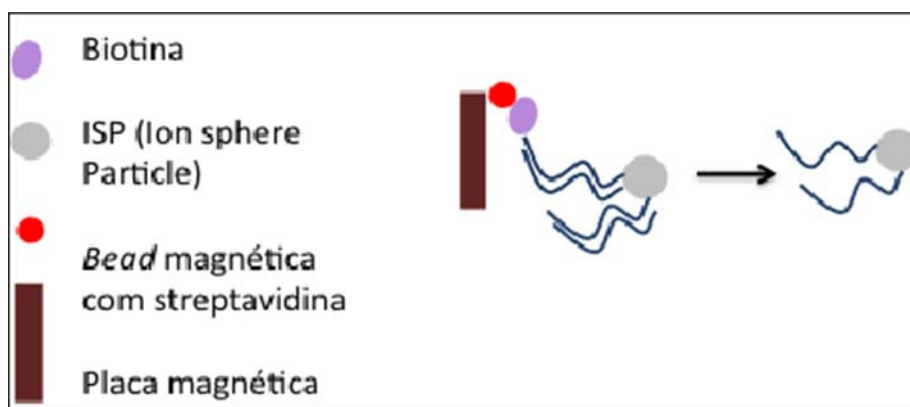
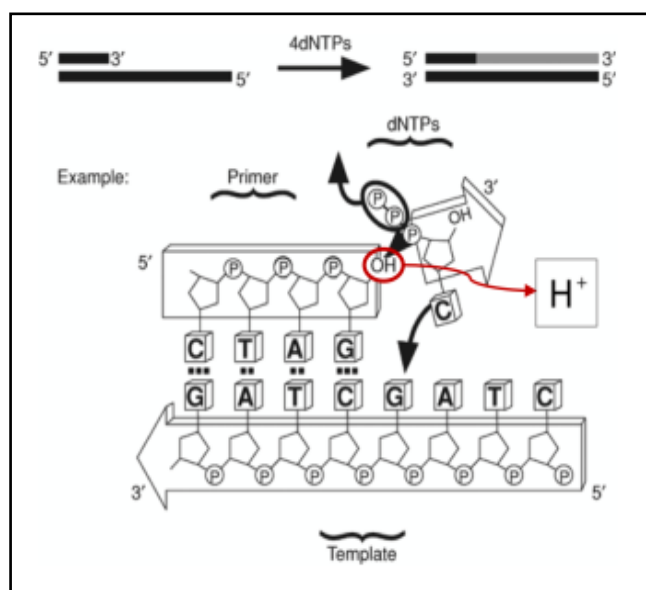


Figura 10 - Enriquecimento da biblioteca amplificada por ePCR

3.7 SEQUENCIAMENTO DE *TP53* EM LARGA ESCALA

As amostras enriquecidas foram depositadas em um chip semicondutor Ion PITM Chip v2 e sequenciadas (Ion PI™ Sequencing 200 Kit v3) na plataforma Ion Proton (Thermo Fisher, EUA), que se baseia na detecção da mudança de pH causada pela liberação de um íon hidrogênio quando nucleotídeos são incorporados. Os chips possuem sensores que captam este sinal a partir de moléculas individuais, possibilitando assim um sequenciamento simultâneo de várias moléculas. Cada íon liberado é detectado e convertido em sinal digital e interpretado como incorporação do nucleotídeo (Figura 11).



Fonte: http://lvaruzza.com/files/apostila_bioinfo_2.0.1.pdf.

Figura 11 – Química do sequenciamento na plataforma Ion Proton

3.8 PAINEL CUSTOMIZADO

Após uma análise cuidadosa dos mais recentes artigos que investigaram perfis mutacionais em CG (BASS et al. 2014; KAKIUCHI et al. 2014; LIU et al. 2014; WONG et al. 2014; CHEN et al. 2015a; CRISTESCU et al. 2015) solicitamos a síntese e adquirimos junto à empresa *Agilent* (USA), um painel customizado, suficiente para sequenciar 16 amostras, cobrindo cerca de 543 mil bases e a maioria dos exons de 113 genes de nosso maior interesse (**Quadro 1**). Os genes deste painel foram sequenciados em 8 amostras de LG, 7 amostras de biópsias tumorais e uma amostra de plasma. Nossa seleção de amostras foi feita de modo a cobrir: i) 7 amostras já com mutação confirmada, incluídas para servirem como validação do painel anterior, ii) 4 amostras de LG negativas para mutações em *TP53* e iii) 5 biópsias tumorais que se mostraram negativas para mutações em *TP53* no sequenciamento anterior.

Quadro 1 - Genes avaliados no painel customizado sintetizado pela empresa *Agilent*.

ABCA13	ABL1	ABL2	ACVR2A	ALK	ALPK2	APC	ARHGAP20	ARHGAP21
ARHGAP37 (STARD13)	ARHGAP5	ARHGEF31 (ECT2)	ARID1A	B2M	BCOR	BCORL1	BNC2	BRCA2
C13orf33	CDH1	CHRD	CIC	CMYA5	COL11A1	COL5A1	CPD	CTCF
CTNNA2	CTNNB1	CUL1	DCHS1 (PCDH16)	DCHS2 (PCDH23)	DCLK1	DMD	DYNC2H1	EGFR
ELF3	EP300	ERBB2	ERBB3	ERBB4	FANCG	FAT4	FBXW7	FGFR1
FLG	FREM2	FRMD4A	FSIP2	GLI3	GPR124	HDAC4	HLA-B	HMCN1
IGF2BP3	IL2RG	IL7R	IMPG2	IRF2	IWS1	KIF13A	KIF2B	KMT2C
KRAS	LAMA1	LARP4B	MACF1	MAP2	MET	MVK	MYEOV	NAA25
NALCN	NF1	NRG1	PAX6	PCDH15	PCDH9	PEG3	PIK3CA	PKHD1
PKHD1L1	PLCG1	PTEN	PTPN23	PTPRC	RBM28	RHGER28 (RGNER)	RHOA	RIMS2
RNF111	RNF43	RPL22	SERPINB8	SLITRK5	SMAD4	SMARCA4	SMARCB1	SOHLH2
SPTA1	SYNE1	TBL1XR1	TGFBR2	THBS1	THSD7B	TMEM63A	TP53	USH2A
VPS13A	ZBTB20	ZFHX4	ZIC4					

Para a confecção da biblioteca usamos um sistema de captura (Agilent -SureSelect^{XT} Target Enrichment System for Illumina Paired-End Sequencing Library Protocol, Califórnia, EUA), empregando 200 ng de DNA de cada amostra. A quantificação do DNA foi feita através do equipamento Qubit (Qubit® 2.0 Fluorometer) e sua integridade (DIN) foi avaliada (Agilent 2200 TapeStation System). Em seguida, as amostras foram fragmentadas no equipamento ultrasonicador Covaris, o que foi feito após um teste de fragmentação com duas amostras, uma de LG (muito fragmentada) e uma de biópsia tumoral (banda única) em diferentes tempos de fragmentação (180 e 360 segundos). O perfil obtido foi avaliado no aparelho Bioanalyzer 2100 (Agilent® High Sensitivity Kit- Califórnia, EUA), gerando picos dentro da faixa esperada, de 120 à 150 pares de bases (pb) (**Figura 12**).

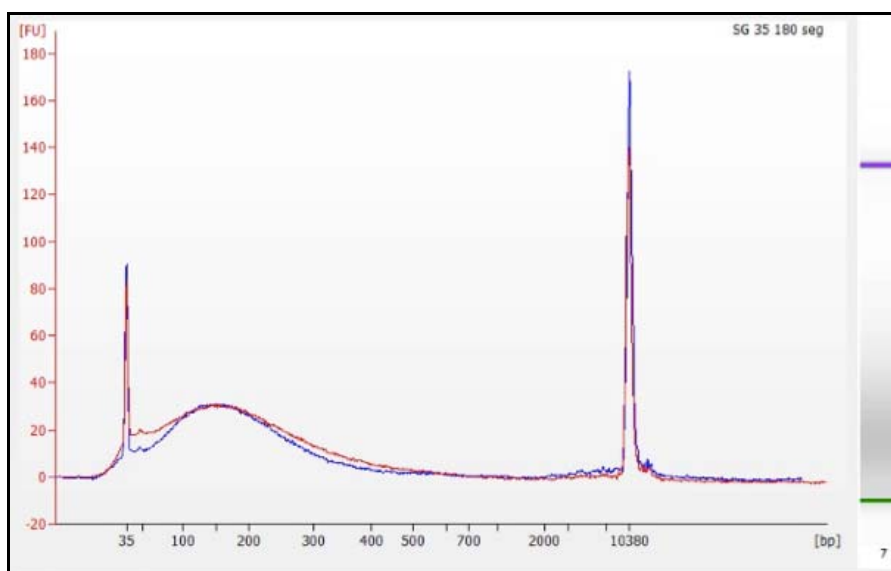


Figura 12 - Teste de fragmentação das amostras de LG e biópsia tumoral. A amostra em vermelho é o LG e em azul a biópsia.

Dessa forma, concluímos que para amostras cujo DIN antes da fragmentação fosse zero, ou inferior a 5,5, a fragmentação ideal seria de 180 segundos e para amostras com DIN acima de 5,5 seria de 360 segundos. A **Figura 13** mostra o perfil do DNA genômico no aparelho *TapeStation* (Agilent, EUA) e os respectivos DINs. A **Figura 14** o perfil das amostras no *Bioanalyzer* após fragmentação.

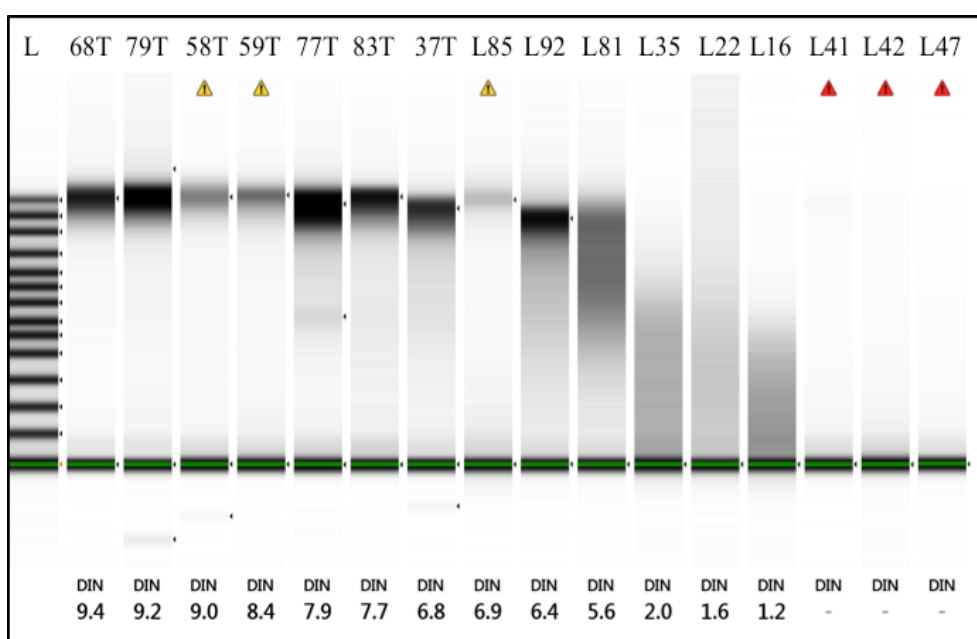


Figura 13 - Integridade do DNA nas amostras utilizadas no painel customizado. Avaliação da integridade do DNA (DIN) das amostras de biópsias tumorais (T) e lavados gástricos (L), antes da fragmentação. Os DINS estão organizados em ordem decrescente.

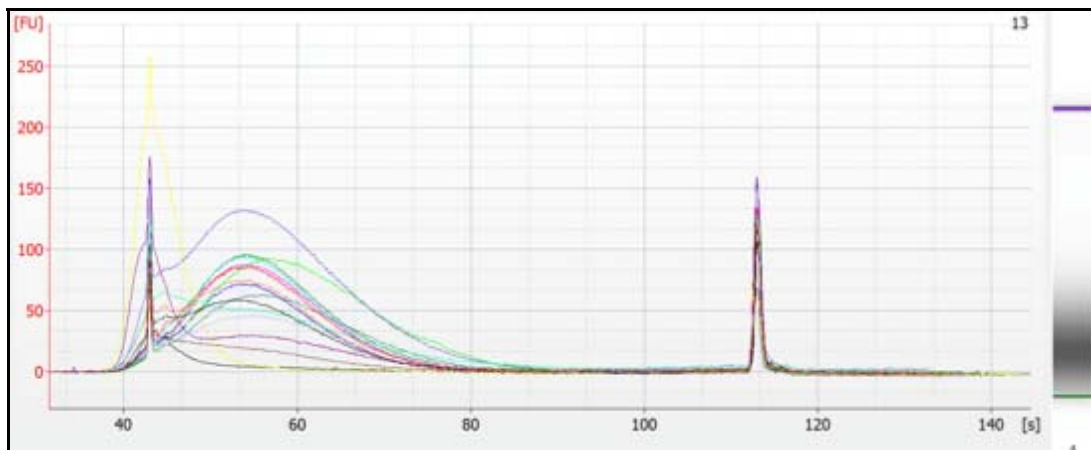


Figura 14 - Perfil das amostras no *Bioanalyzer* após a fragmentação no Covaris. A escala no eixo x se encontra em segundos devido a análise em conjunto de todas as amostras, mas ressaltamos que este intervalo de tempo corresponde ao tamanho esperado.

Após a fragmentação, foi feita a reparação das extremidades dos fragmentos, já que a fragmentação no aparelho *Covaris* é feita por ultrasonicação randômica e pode gerar quebras incompatíveis com a extremidade requerida para a ligação dos adaptadores. A seguir, prosseguimos com a purificação dos fragmentos usando 180 μ l do reagente *Agencourt® AMPure® XP*, composto por esferas magnéticas que se ligam ao DNA e permitem eliminar tampões e enzimas da solução, sendo a mistura incubada à temperatura ambiente por 5 min seguido do descarte do sobrenadante em estante magnética. Após lavagem do DNA por 2X com álcool 70%, partimos para a adenilação das extremidades dos fragmentos, o que permite a ligação dos adaptadores que possuem um *overhang* de timina. Os adaptadores foram então ligados aos produtos purificados utilizando os adaptadores denominados de “*SureSelect Adaptor Oligo Mix*”. A reação foi

incubada no termocilador a 20°C por 15 minutos, as amostras foram purificadas com esferas magnéticas e em seguida, as bibliotecas foram amplificadas por PCR. Para as amostras com DIN >5,5 fizemos 10 ciclos de PCR, enquanto que as amostras com DIN <2 passaram por 13 ciclos. Isso foi sugerido pela empresa Agilent, devido a baixa qualidade de algumas amostras. Posteriormente as bibliotecas passaram por um passo de controle de qualidade no *Bioanalyzer*, onde o tamanho esperado do pico está entre 225 a 275 pb.

Tendo observado todas as amostras dentro do tamanho esperado, o próximo passo foi a hibridação com as sondas de RNA customizadas para os nossos alvos. A reação de hibridação requer 750 ng de DNA em um volume de 3,4µl de cada amostra. Em seguida, as amostras foram incubadas em um termociclador por no mínimo 16 horas a 65°C, com a tampa aquecida a 105°C. Após a incubação, a biblioteca (que nesta etapa consiste em DNA ligado às sondas) foi capturada por esferas magnéticas de estreptavidina (*Dynabeads MyOne Streptavidin T1 magnetic beads*) e amplificada com os respectivos *barcodes* com 14 ciclos de PCR. Em seguida, foi feita uma última etapa de purificação e novo controle de qualidade no *Bioanalyzer* que demonstrou termos os picos dentro da faixa de tamanho esperado, entre 250 e 350 pb (**Figura 15**).

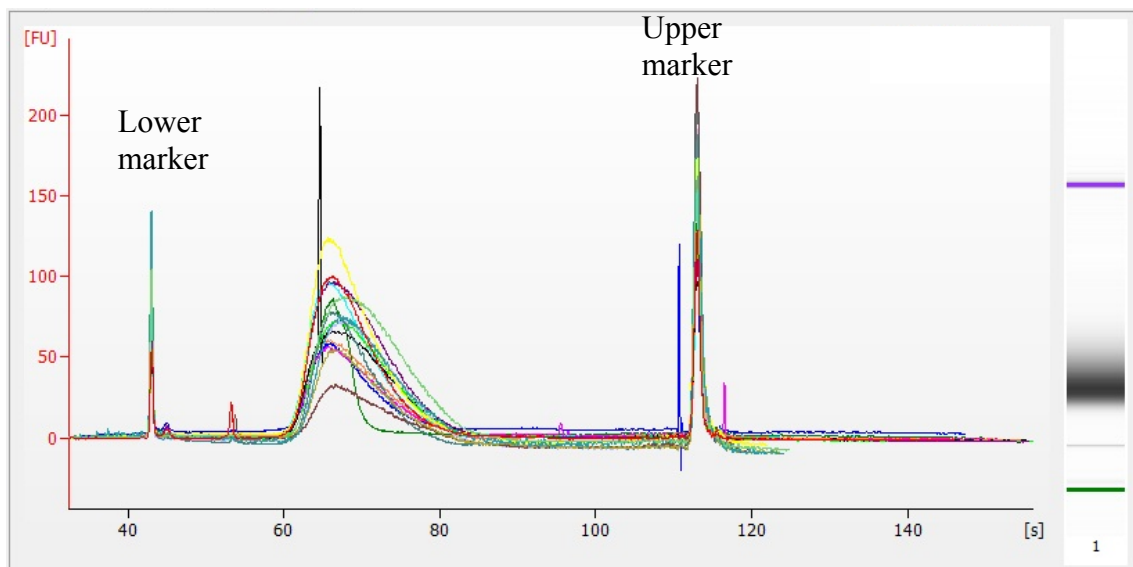


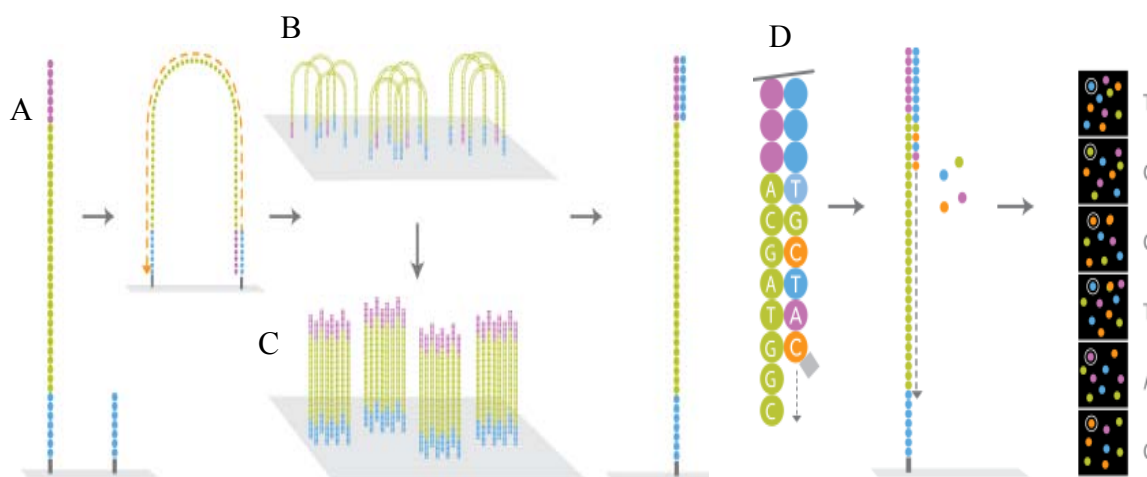
Figura 15 - Perfil no *Bioanalyzer* após término da construção das bibliotecas. A escala no eixo x se encontra em segundos devido a análise em conjunto de todas as amostras, no entanto, este intervalo de tempo corresponde ao tamanho esperado. Pico esperado era de 250 à 350 pb.

3.9 SEQUENCIAMENTO DO PAINEL CUSTOMIZADO

O sequenciamento do painel gênico customizado foi realizado no equipamento NextSeq, Illumina (EUA). Nesta plataforma, as moléculas de DNA da biblioteca são hibridadas a oligonucleotídeos que estão ligados na *flowcell* e amplificadas. Após amplificada, a molécula de DNA que serviu de molde será removida por lavagens do sequenciamento, e a fita amplificada irá fazer uma “ponte”, permitindo que a ponta livre do fragmento se ligue a um novo oligonucleotídeo fixado na *flowcell*. Assim, será feita uma nova amplificação e esse ciclo se repetirá várias vezes. Na medida que ocorre a amplificação o nucleotídeo incorporado é concomitantemente lido pelo aparelho. A **Figura 16** ilustra essa reação, chamada de PCR em ponte

(*bridge PCR*), que permite a formação de grupos de amplicons (milhares de moléculas idênticas em uma mesma região da *flowcell*), possibilitando a leitura da fluorescência pelo aparelho.

Este equipamento gera até 260 milhões de *reads*, e sua leitura é feita em 2 cores, sendo que a incorporação de timinas emite uma luz de cor verde, citosinas na cor vermelha, adeninas em amarelo (verde+vermelho) e guanina sem cor (ausência de fluorescência) (BRONNER et al. 2014). Esta plataforma tem sido amplamente utilizada, por seu alto rendimento e alta qualidade de sequenciamento.



Fonte: https://www.dkfz.de/gpcf/hiseq_technology.html

Figura 16 - Química do sequenciamento na plataforma Illumina. Podemos ver em A, uma molécula de DNA com diferentes cores nas extremidades, que irá se ligar aos oligonucleotídeos fixados na *flowcell* (representado em cinza na base dos fragmentos). Em B a PCR em ponte. Em C a formação dos grupos. D, mostra um esquema da leitura da fluorescência do nucleotídeo no equipamento HiSeq que lê quatro cores.

4 ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA

A análise bioinformática dos dados gerados foi coordenada pelo grupo de Bioinformática do Centro de Pesquisas do A.C.Camargo Cancer Center, liderado pelo Dr. Israel Tojal. Para a identificação das variantes alélicas, utilizamos o *Software TVC – Torrent Variant Caller*, seguindo o pipeline do *Ion Torrent* (<http://mendel.iontorrent.com/ion-docs/Torrent-Variant-Caller-Plugin.html>), para alinhar os *reads* contra os genes alvo no genoma humano (versão hg19). Em seguida, estes dados foram analisados manualmente na plataforma de visualização IGV- *Iterative Genomics Viewer*, a fim de permitir uma avaliação cuidadosa das alterações indicadas pelo programa *Ion Torrent*.

Para isso, utilizamos alguns parâmetros já estabelecidos pelo nosso grupo em outros projetos e ajustados às condições aqui empregadas: i) a região contendo a suposta alteração deve ter uma cobertura vertical mínima de 500X; ii) a base nucleotídica alterada deve ter uma qualidade *phred* ≥ 20 ; iii) a variação deve ter uma cobertura equilibrada (entre 40% e 60%) nas fitas positiva e negativa do DNA; iv) a base variante deve estar a pelo menos 5 nucleotídeos de distância do término ou do início do amplicon sequenciado; v) *indels* não foram considerados quando localizados em regiões de homopolímeros (repetição *in tandem* do mesmo nucleotídeo por pelo menos 4 vezes); vi) a base alterada deve ter uma frequência inferior a 25%, a fim de remover SNPs ou alterações em linhagem germinativa.

Diante da alta cobertura que tivemos no painel *Ampliseq* de *TP53*, que deve permitir detectar mutações mesmo em baixa frequência (inferior a 1%), vimos a necessidade de estabelecer filtros suplementares com base estatística que removessem ruídos do sequenciamento que restassem mesmo após o uso dos cinco parâmetros acima listados. A princípio realizamos uma análise de remoção de ruídos de sequenciamento de modo específico para os diferentes tipos de amostras incluídas neste estudo: biópsia tumoral do estômago de tecido congelado e parafinado, LG, plasma e leucócitos. A implementação destes filtros nos pareceu necessária diante de variações que observamos na qualidade do sequenciamento de amostras com diferentes origens. Por exemplo, a qualidade do sequenciamento de amostras de LG ou biópsias tumorais é inferior à qualidade do sequenciamento de DNA derivado do plasma, o que pode influenciar na quantidade de ruído durante o *base-calling*. Sendo assim, a ideia geral destes filtros foi estabelecer critérios que fossem capazes de remover trocas espúrias que ocorram com maior frequência em um dado tipo de amostra, ou característicos da plataforma de sequenciamento usada neste estudo. Os filtros aplicados neste ponto foram:

1) Filtro A: ruído de trocas de bases específicas - Avaliamos em todos os nossos dados de sequenciamento, a frequência de todas as seis possíveis trocas de base única (considerando as duas fitas do DNA) ocorridas ao longo do gene alvo. Diferentemente do filtro #3, este filtro opera de modo independente da localização da alteração. Deste modo, contabilizamos todas as trocas C:G>A:T, C:G>G:C, C:G>T:A, T:A>A:T,

T:A>C:G e T:A>G:C. A seguir, calculamos a média e o desvio padrão de cada uma destas trocas, estabelecendo assim um nível de corte. Os resultados deste filtro são apresentados na **Tabela 2** (para todos os tipo de amostra que avaliamos) e na **Figura 17** que exemplifica os achados destas trocas em LG.

2) Filtro B: ruído em contextos de trinucleotídeos - Este filtro é similar ao anterior, no entanto ele amplia o motivo de busca incluindo as bases que flanqueiam imediatamente a base alterada a 5' e também a 3'. Isto gera um alfabeto de 96 possibilidades de trinucleotídeos albergando a base alterada no nucleotídeo mais central (por exemplo, a troca C>G no contexto do tripleto CCC>CGC). Para cada uma das 96 possibilidades, calculamos a médias e o desvio padrão para todos os tipos de amostra do estudo. Os resultados deste filtro são apresentados no **Anexo 4** (para todos os tipo de amostra que avaliamos) e na **Figura 18** exemplifica os achados destas trocas em LG.

3) Filtro C: ruído de variação posicional - Por fim, como sabemos que o genoma de uma célula é uma estrutura enovelada, onde as regiões da cromatina são diferencialmente expostas, avaliamos também o ruído de sequenciamento de modo posicional. Deste modo, para todas as bases do gene *TP53*, avaliamos qual o ruído de sequenciamento observado nos diversos tipos de amostras. Os resultados deste filtro são apresentados na **Tabela 3** (para todos os tipo de amostra que avaliamos) e na **Figura 19** que exemplifica os achados destas trocas em LG.

Por fim, consolidando as análises de todos estes filtros, apenas consideramos uma mutação como real se ela estivesse presente em uma frequência superior à média mais um desvio padrão do ruído mais alto calculado por um destes métodos, sempre considerando valores de modo específico para cada tipo de amostra.

Para deixar mais claro, exemplificamos isto com dados reais de duas alterações, uma considerada validada (1) e outra considerada não-validada (2):

- 1) Alteração C>T, no contexto CCG>CTG, localizada na base 7577548 de *TP53*, observada no paciente 9. Vemos que esta alteração tem a frequência de 10,14% na biópsia e também foi encontrada em 8,61% dos *reads* no LG e 1,29% no plasma. Vemos que os valores de corte na biópsia para os filtros de ruídos A, B e C (descritos acima e já somados com 1X o desvio padrão), foram: de A-0,43%, B-0,91%, e 3,4%. No LG os valores dos filtros de ruído foram: A-0,5%, B-0,7% e C-5%, enquanto que no plasma estes foram: A-0,28%, B-0,86% e C-0,1%. Deste modo, a alteração foi considerada validada em todas as amostras.
- 2) Alteração G>A, no contexto GGA>GAA, localizada na base 7578550 de *TP53*, observada no paciente 14. Vemos que esta alteração tem a frequência de 6,01% na biópsia e também foi encontrada com a frequência de 0,15% no LG e 0,18% no plasma. Vemos que os valores de corte para os filtros de ruído A, B e C (igualmente já adicionados os valores de 1X o desvio padrão) foram de: A-0,43%,

B-0,14% e C-0,14% (para biópsia); A-0,5%, B-0,24% e C-0,06% (LG) e A-0,28%, B-0,15% e C-0,14% (plasma). Deste modo, a alteração foi considerada validada na biópsia, mas não validada no LG ou no plasma, pois as freqüências observadas nestes foram inferiores a certos valores de corte mais altos destes filtros.

Tabela 2 - Valores estatísticos para o filtro de ruído de trocas de bases específicas, para todos os tipos de amostras.

Amostra	Troca	Média (%)	Desvio padrão (%)	M+D (%)	M +2D (%)
FFPE	A>C	0,06	0,23	0,29	0,52
FFPE	A>G	0,22	0,40	0,61	1,01
FFPE	A>T	0,06	0,14	0,20	0,34
FFPE	C>A	0,26	0,64	0,90	1,54
FFPE	C>G	0,23	0,68	0,90	1,58
FFPE	C>T	0,24	0,93	1,17	2,10
Média		0,18	0,50	0,68	1,18
leuco	A>C	0,04	0,11	0,14	0,25
leuco	A>G	0,14	0,08	0,22	0,30
leuco	A>T	0,03	0,03	0,06	0,10
leuco	C>A	0,03	0,05	0,08	0,13
leuco	C>G	0,04	0,07	0,10	0,17
leuco	C>T	0,07	0,09	0,16	0,24
Média		0,06	0,07	0,13	0,20
PL	A>C	0,06	0,14	0,20	0,33
PL	A>G	0,17	0,09	0,27	0,36
PL	A>T	0,04	0,05	0,09	0,14
PL	C>A	0,05	0,08	0,13	0,22
PL	C>G	0,06	0,11	0,17	0,27
PL	C>T	0,08	0,20	0,29	0,49
Média		0,08	0,11	0,19	0,30
LG	A>C	0,04	0,12	0,16	0,28
LG	A>G	0,15	0,27	0,42	0,69
LG	A>T	0,03	0,09	0,13	0,22
LG	C>A	0,04	0,19	0,23	0,42
LG	C>G	0,04	0,12	0,16	0,27
LG	C>T	0,09	0,42	0,51	0,93
Média		0,07	0,20	0,27	0,47
B	A>C	0,04	0,17	0,22	0,39
B	A>G	0,15	0,22	0,37	0,60
B	A>T	0,03	0,04	0,07	0,12
B	C>A	0,03	0,06	0,09	0,14
B	C>G	0,04	0,11	0,16	0,27
B	C>T	0,08	0,35	0,43	0,78
Média		0,06	0,16	0,22	0,38

Legenda: M- Média; D- Desvio padrão; FFPE- Biópsia proveniente de tecido parafinado; leuco- Leucócito; PL- Plasma; LG- LG; B- Biópsia

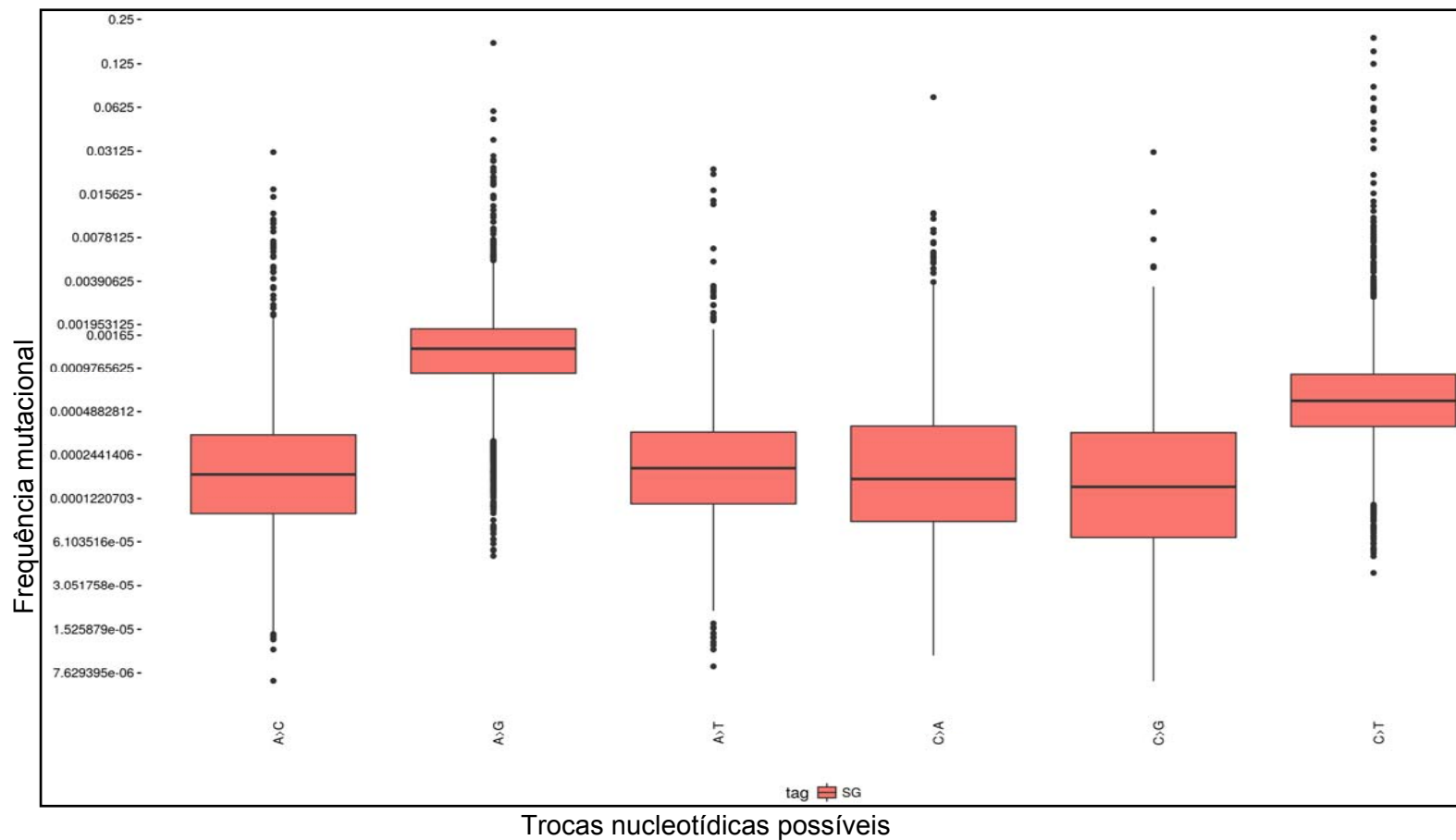


Figura 17 – Filtro da bioinformática pelo ruído de trocas de bases específicas no LG. As caixas significam a frequência mutacional de 50% das amostras, a linha no meio da caixa significa a mediana, a linha inferior o primeiro quartil (diminuindo 25% o valor da mediana), a linha superior da caixa o terceiro quartil (somado 25% o valor da mediana).

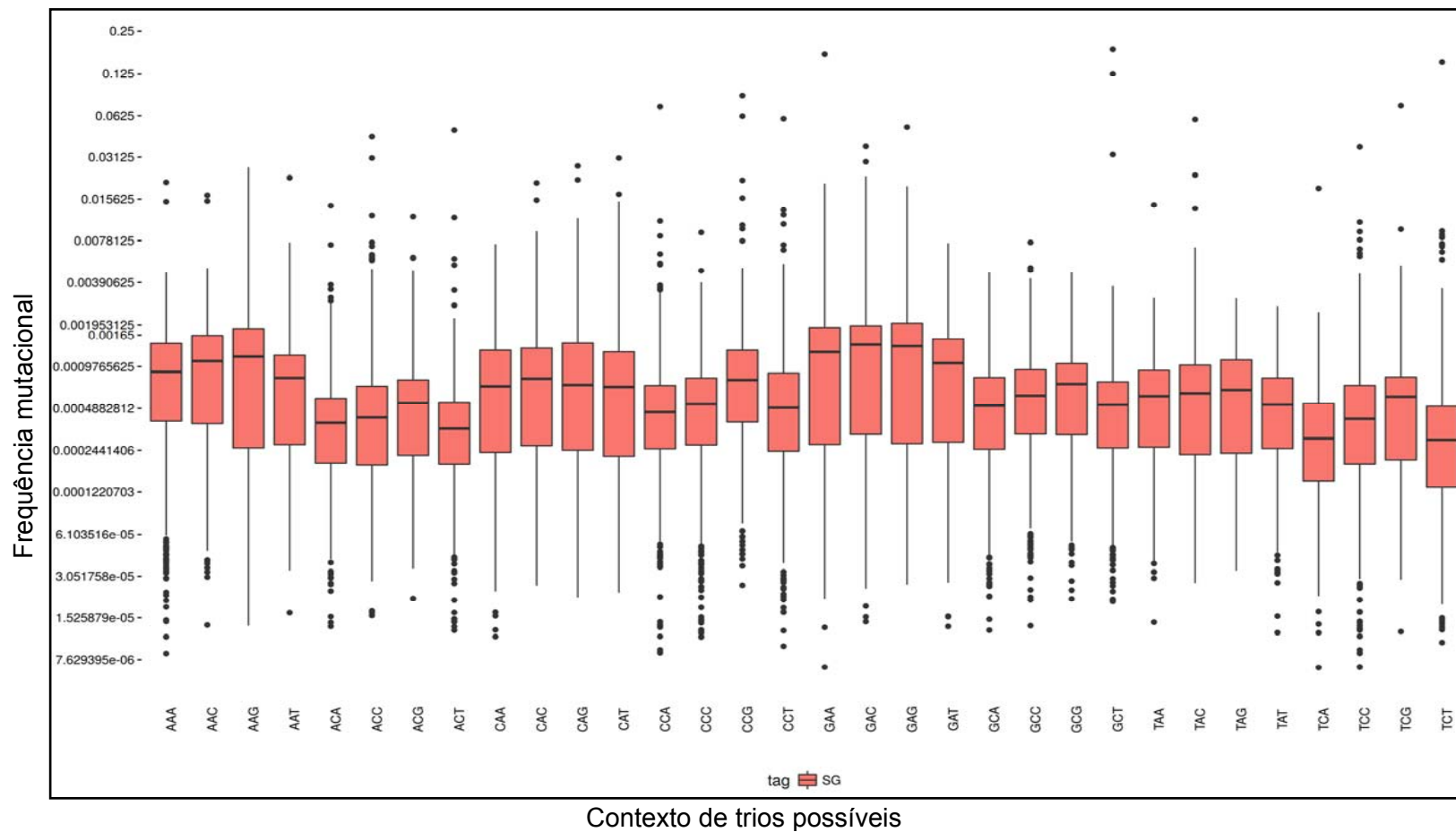


Figura 18 – Filtro da bioinformática pelo ruído no contexto de trinucleotídeos no LG. As caixas significam a frequência mutacional de 50% das amostras, a linha no meio da caixa significa a mediana, a linha inferior o primeiro quartil (diminuindo 25% o valor da mediana), a linha superior da caixa o terceiro quartil (somado 25% o valor da mediana).

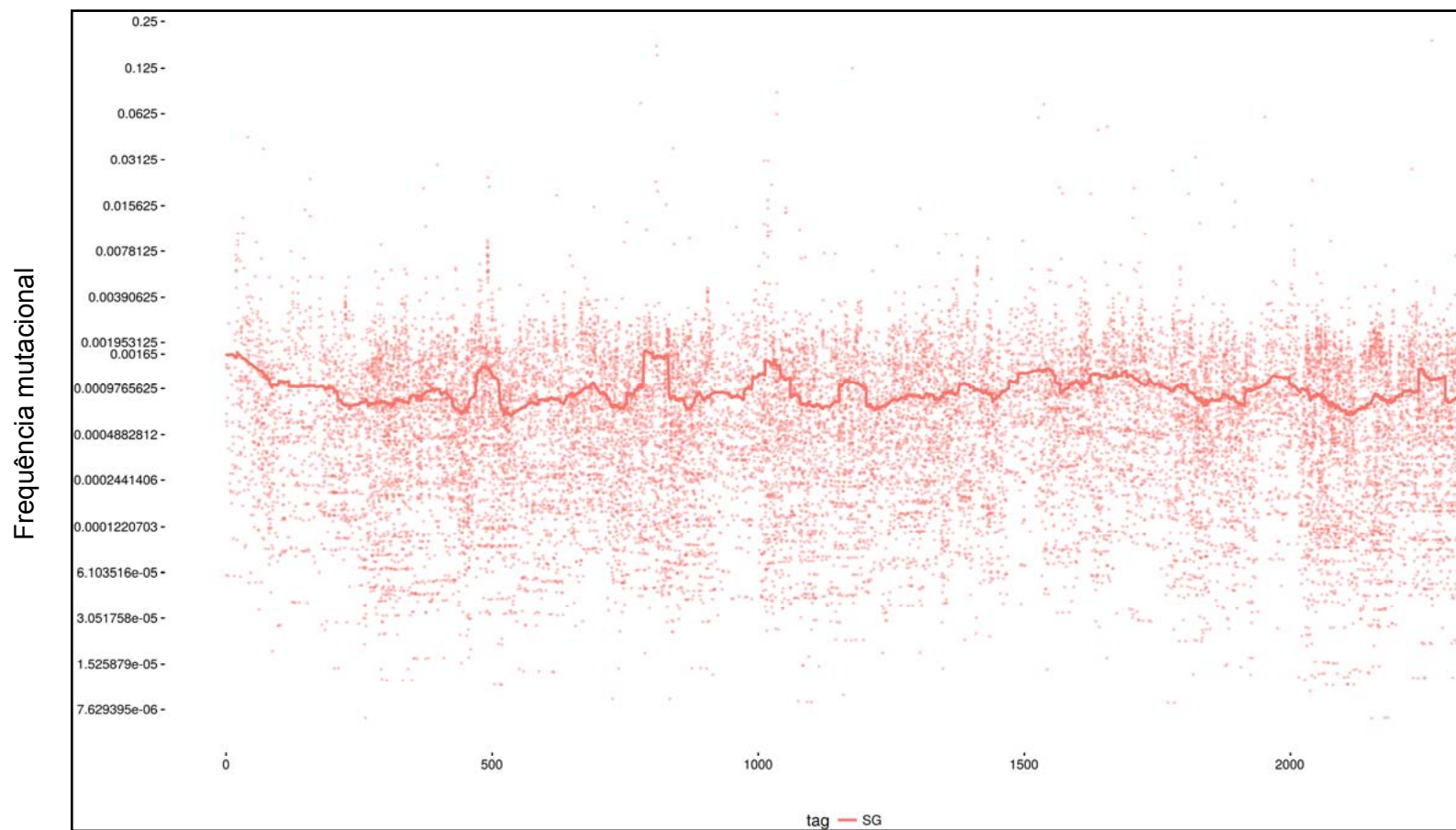
Tabela 3 - Valores estatísticos para o filtro no contexto da posição gênômica para todos os tipos de amostra

Amostra	Posição gênômica	Média (%)	Desvio padrão (%)	M+D (%)	M+2D (%)
FFPE	7577094	0,41	0,57	0,98	1,54
FFPE	7578503	0,04	0,04	0,08	0,12
FFPE	7577538	0,09	0,10	0,19	0,28
FFPE	7578475	0,26	0,39	0,65	1,04
FFPE	7579575	0,04	0,02	0,07	0,09
FFPE	7578212	1,05	1,79	2,84	4,62
FFPE	7577548	0,59	1,28	1,87	3,15
FFPE	7577120	8,69	11,53	20,21	31,74
FFPE	7577121	0,09	0,04	0,13	0,18
FFPE	7578195	0,33	0,64	0,97	1,62
FFPE	7578550	0,22	0,25	0,47	0,71
FFPE	7578268	0,10	0,07	0,18	0,25
Média		0,99	1,39	2,39	3,78
leuco	7577094	0,08	0,04	0,12	0,16
leuco	7578503	0,05	0,04	0,08	0,12
leuco	7577538	0,05	0,03	0,07	0,10
leuco	7578475	0,19	0,12	0,32	0,44
leuco	7579575	0,05	0,03	0,07	0,10
leuco	7578212	0,15	0,04	0,19	0,23
leuco	7577548	0,04	0,03	0,07	0,10
leuco	7577120	0,04	0,03	0,07	0,09
leuco	7577121	0,05	0,03	0,08	0,11
leuco	7578195	0,05	0,02	0,07	0,09
leuco	7578550	0,08	0,07	0,15	0,22
leuco	7578268	0,10	0,04	0,13	0,17
Média		0,08	0,04	0,12	0,16
PL	7577094	0,52	2,65	3,16	5,81
PL	7578503	0,18	0,32	0,50	0,82
PL	7577538	0,06	0,04	0,10	0,14
PL	7578475	0,32	0,69	1,00	1,69
PL	7579575	0,05	0,03	0,08	0,12
PL	7578212	0,16	0,08	0,24	0,33
PL	7577548	0,06	0,04	0,10	0,14
PL	7577120	0,05	0,04	0,08	0,12
PL	7577121	0,06	0,04	0,11	0,15
PL	7578195	0,07	0,04	0,11	0,15
PL	7578550	0,09	0,05	0,15	0,20
PL	7578268	0,14	0,08	0,21	0,29
Média		0,15	0,34	0,49	0,83

Cont/Tabela 3

Amostra	Posição gênomic	Média (%)	Desvio padrão (%)	M+D (%)	M+2D (%)
LG	7577094	0,16	0,32	0,47	0,79
LG	7578503	0,06	0,05	0,11	0,16
LG	7577538	0,30	0,57	0,86	1,43
LG	7578475	0,19	0,13	0,32	0,44
LG	7579575	0,06	0,03	0,09	0,11
LG	7578212	0,08	0,05	0,14	0,19
LG	7577548	1,76	3,27	5,03	8,31
LG	7577120	0,03	0,02	0,05	0,08
LG	7577121	0,06	0,03	0,09	0,13
LG	7578195	0,06	0,03	0,09	0,13
LG	7578550	0,03	0,03	0,06	0,09
LG	7578268	0,07	0,05	0,12	0,17
Média		0,24	0,38	0,62	1,00
B	7577094	0,69	2,34	3,03	5,37
B	7578503	0,06	0,04	0,11	0,15
B	7577538	0,05	0,04	0,09	0,13
B	7578475	0,24	0,13	0,37	0,50
B	7579575	0,68	2,46	3,14	5,59
B	7578212	0,11	0,08	0,19	0,28
B	7577548	0,70	2,78	3,48	6,27
B	7577120	0,05	0,03	0,08	0,11
B	7577121	0,69	2,44	3,12	5,56
B	7578195	0,05	0,03	0,08	0,11
B	7578550	0,08	0,06	0,14	0,20
B	7578268	0,23	0,73	0,97	1,70
Média		0,30	0,93	1,23	2,16

Legenda: M- Média; D- Desvio padrão; FFPE- Biópsia proveniente de bloco de parafina; leuco- Leucócito; PL- Plasma; LG- LG; B- Biópsia.



Alterações distribuídas em todo gene *TP53*

Figura 19 – Filtro da bioinformática pelo ruído de variação posicional distribuídas por todo o gene. A linha indica a média das alterações.

De maneira concisa, a análise bioinformática feita para o painel customizado foi similar àquela aplicada no *Ion Proton*. Porém, com alguns filtros diferentes. O *pipeline* seguiu a seguinte ordem: i) Os dados do sequenciamento (arquivos BAM) foram recalibrados de acordo com a qualidade das bases no programa GATK. ii) A chamada de variantes foi feita no programa SAMtools (<http://samtools.sourceforge.net/>); iii) Aplicamos filtros para exclusão de variantes acima de 25% de frequência (para desconsiderar os SNPs); filtro de *strand-bias* removendo todas as alterações que não estivessem representadas cada fita em uma frequência de pelo menos 30%; filtro de cobertura vertical mínima de 50X e filtro que exige que cada alteração tenha pelo menos 10 *reads* contendo a base alterada. Não aplicamos os filtros de ruído para todos os genes do painel, mas isto será feito posteriormente.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DAS AMOSTRAS SEQUENCIADAS

Foram recrutados 46 pacientes, sendo 44 provenientes do A.C.Camargo Cancer Center e 2 do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais (Belo Horizonte, MG) graças à nossa colaboração com o Prof. Dr. Luiz Gonzaga Vaz Coelho. Destes 44 pacientes, foi possível obter amostras de LG e plasma após o tratamento (QT ou cirúrgico) de 31 (70,5%). Os pacientes foram classificados em 3 grupos de acordo com o subtipo histológico, sendo eles: i) subtipo intestinal, n=15 (32,6%) pacientes; ii) subtipo difuso, n=24 (52,2%) pacientes e iii) 7 casos (15,2%) cujo diagnóstico anatomopatológico da biópsia inicial foi distinto da peça cirúrgica sendo aqui denominados como “outros” (**Quadro 2**). Para o grupo “outros”, como a divergência pode ser resultado de ação da QT que alterou a composição inicial e alterou a classificação da peça cirúrgica, optamos por usar a classificação de “outros” ao invés de usar a classificação da peça obtida após a QT. A maior proporção de pacientes do subtipo difuso em nossa coorte é um aspecto notável, haja visto que coletamos amostras consecutivas sem qualquer viés de seleção, e corrobora entre nós o aumento desse subtipo, como descrito para outras regiões do mundo (CARL-MCGRATH et al. 2007). Entretanto,

temos ciência de que um n=46 não é suficiente para maiores conclusões e estudos mais amplos envolvendo um maior número de pacientes, já foram implementados em projeto temático coordenado por nosso grupo, para avaliar essa tendência em nossa população.

Quadro 2 - Dados clínico-patológicos dos pacientes recrutados.

	Sexo	Idade	Local	EC	EP	Metástase	Tto inicial	Histologia	H pylori	Her 2	
Iniciais	M	64	Distal	0	pt2N0Mx	Ausente	Muc	Intestinal	Neg	Neg	
	M	75	Distal	0	NI	Ausente	Muc	Intestinal	Pos	Neg	
	M	80	Distal	0	NI	Ausente	Muc	Intestinal	Neg	Neg	
	M	79	Distal	0	NI	Ausente	Muc	Intestinal	Neg	Neg	
Não metastáticos	M	68	Distal	0	NI	Ausente	Muc	Intestinal	NI	NI	
	F	76	Distal	NI	NI	Ausente	QT	Intestinal	Neg	Neg	
	M	48	Distal	NI	ypT0ypN0ypMx	Ausente	QT	Intestinal	Pos	Neg	
	M	89	Distal	IIA	NO	Ausente	QT	Intestinal	Neg	Neg	
	F	66	Distal	III	ypTis ypN0	Ausente	QT	Intestinal	Neg	Neg	
Metastático	M	61	Distal	III	ypT4aypN1ypMx	Ausente	QT	Intestinal	Neg	Neg	
	F	58	Proximal	IV	NO	Fígado e pulmão	QT	Intestinal	Pos	Pos	
	F	77	Proximal	IV	NO	Fígado e pulmão	QT	Intestinal	Neg	Neg	
	M	58	Proximal	IV	NO	Fígado e adrenal	QT	Intestinal	Neg	Pos	
	M	69	Proximal	IV	NO	Fígado	QT	Intestinal	Neg	Neg	
Não metastáticos	M	72	Distal	IV	NO	Fígado	QT	Intestinal	Neg	Neg	
	M	59	Coto gastrico distal	NI	pT4bN2Mx	Ausente	QT	Difuso	Neg	Neg	
	F	82	Distal	III	ypT4aN0M0	Ausente	QT	Difuso	Neg	Neg	
	M	58	Distal	III	ypT2ypN3aypMx	Ausente	QT	Difuso	Neg	Neg	
	F	56	NI	II	ypT1aypN0M0	Ausente	QT	Difuso	Neg	Pos	
	F	52	Distal	II	ypT1b ypN0 ypMx	Ausente	QT	Difuso	Neg	Neg	
	M	47	Distal	II B	ypT2 ypN3b ypMx	Ausente	QT	Difuso	Neg	Neg	
	M	63	Distal	IA	pT1a pN0 pMX	Ausente	C	Difuso	Pos	Neg	
	F	52	Distal	I	ypT2pN0M0	Ausente	QT	Difuso	Pos	Neg	
	M	78	Distal	III	NO	Ausente	Sem tto	Difuso	Neg	Neg	
	F	39	Distal	III	NO	Ausente	QT	Difuso	Pos	Neg	
	M	41	Proximal	NI	pT1bpN0	Ausente	C	Difuso	Neg	Neg	
	F	54	Distal	II A	ypT3 ypN0 ypMx	Ausente	QT	Difuso	Neg	Neg	
	F	32	Distal	NI	uT3N+Mx	NI	C	Difuso	NI	NI	
	Metastático	M	74	Distal	IV	NO	Peritônio	QT	Difuso	Neg	Neg
		M	70	Proximal	IV	NO	Linfonodos	QT	Difuso	Neg	Pos
		M	40	Distal	IV	NO	Fígado e peritônio	QT	Difuso	Pos	Neg
		M	38	Distal	IV	NO	Peritônio	QT	Difuso	Pos	Neg
		M	40	Distal	IV	ypT4aypN0ypMx	Peritônio	QT	Difuso	Pos	Neg
		F	49	Distal	IV	NO	Peritônio	QT	Difuso	Neg	Neg
M		70	Distal	IV	NO	Peritônio	QT	Difuso	Neg	Neg	
M		52	Todo menos antro distal	IV	NO	Peritônio	QT	Difuso	Neg	Neg	
M		52	Distal	IV	NO	Peritônio	QT	Difuso	Neg	Neg	
M		59	Distal	IV	NO	Peritônio	QT	Difuso	Neg	Pos	
Não metastáticos	M	47	NI	IV	NO	Peritônio	QT	Difuso	Neg	Neg	
	F	61	Distal	IB	ypT3 ypN2 ypMx	Ausente	QT	*	Neg	Pos	
	F	71	Distal	III A	ypT4ypN0	Ausente	QT	*	Pos	Neg	
	F	46	Distal	NI	pT1b pN0Mx	Ausente	C	*	Neg	Neg	
	M	59	Distal	III	ypT4a ypN2 pMx	Ausente	QT	*	Neg	Neg	
	M	54	Proximal	II B	ypT2ypN0	Ausente	QT	*	Neg	Neg	
	M	80	Distal	NI	pT1 pN0 pMx	Ausente	C	*	Neg	Neg	
	M	70	Distal	II A	ypT2 ypN0 ypMx	Ausente	QT	*	Neg	Neg	

Legenda: As diferentes cores separam os grupos, sendo em laranja o subtipo intestinal, em azul o subtipo difuso e em rosa o agrupamento dos outros tumores. M-Masculino; Muc-Mucosectomia; F- Feminino; EC- Estadiamento clínico; EP- Estadiamento patológico; Neg-Negativo; Pos- Positivo; QT- Quimioterapia; C-Cirurgia; *- Sem classificação patológica definida; NO- Não operado; NI- Não informado; tto- Tratamento

Para os tumores do tipo intestinal, alocamos os 15 casos em três subgrupos: tumores iniciais, tumores não-metastáticos e tumores metastáticos, com 5 (33,3%) pacientes em cada subgrupo. Já os 24 tumores do subtipo difuso, foram separados em dois subgrupos: tumores não-metastáticos (n=13; 54,2%) e metastáticos (n=11; 45,8%), e para o grupo classificado como “outros”, todos os pacientes (n=7) foram identificados como tumores não-metastáticos. Nossa casuística consistiu em 31/46 homens (67,4%) e 15/46 mulheres (32,6%), proporção esta em acordo com a literatura (WADDELL et al. 2013).

A idade média ao diagnóstico foi de 61,7 anos para homens e 58 anos para as mulheres (p=0,386). Sendo que a idade média para os homens com ADG do subtipo intestinal foi 69,3 anos e 55,5 anos para o subtipo difuso, sendo esta diferença significativa (p=0,0112). Para as mulheres foi 69,2 anos para o subtipo intestinal e 52 anos para o difuso, com uma diferença também significativa (p=0,0424). Em concordância com dados globais, onde a idade média para pacientes com tumores do subtipo intestinal se mostrou mais elevada (69 x 54 anos para o subtipo difuso), sendo esta diferença significativa (p=0,001) (TAN e YEOH 2015).

Metástases ocorreram em 45,8% (n=11) dos pacientes do subtipo difuso e em 33,3% (n=5) dos pacientes do subtipo intestinal e não foram observadas metástases no grupo “outros”, porém essa diferença não foi significativa (p=0,094). Dentre os pacientes do subtipo difuso metastático, 90,9% (n=10/11) desenvolveram metástase peritoneal; nenhum caso do subtipo intestinal apresentou metástases para este sítio. Todos os pacientes

metastáticos do subtipo intestinal (n=5) apresentaram disseminação metastática hepática, achado observado em apenas um paciente do grupo difuso. Esse dado é concordante com a literatura que relata uma maior disseminação do subtipo difuso pela via linfática e para o peritônio, enquanto o subtipo intestinal dissemina-se preferencialmente para o fígado, e pela via hematogênica (GRABSCH e TAN 2013). Além disso, 80% (n=4/5) dos casos metastáticos do grupo intestinal têm a localização do tumor primário na porção proximal do estômago, opondo-se a 9% (n=1/11) do subtipo difuso. Esse dado se opõe aos relatados na literatura, já que o subtipo intestinal é visto frequentemente na parte distal do estômago (SAIKAWA et al. 2010), no entanto, mais uma vez temos que ressaltar nossa pequena casuística.

Em relação à localização do tumor, 76% (n=35) de todos os casos estavam localizados na porção distal do estômago, sendo 73,3% (n=11) do subtipo intestinal e 75% (n=18) do subtipo difuso. Quanto aos tumores proximais (n=7, 15,2%), 26,7% (n=4) são do subtipo intestinal e 12,5% (n=3) do subtipo difuso. Esse dado difere da literatura, pois esperaríamos encontrar uma maior proporção de tumores de cárdia (proximal) em pacientes ocidentais, visto que os tumores distais são frequentemente associados aos pacientes asiáticos (KIM et al. 2010).

A infecção por *H. pylori* foi positiva ao diagnóstico em 22,7% (n=10) dos 44 casos avaliados. Quando separada por grupos, 20% (n=3) dos pacientes do subtipo intestinal foram HP+, 25% (n=6) do subtipo difuso e somente um caso (14,3%) no grupo “outros”. Entretanto, alguns pacientes descreveram história prévia dessa infecção, mas, este dado não pode ser

confirmado para a maioria devido à ausência de exames que comprovassem o diagnóstico da infecção.

Em relação a amplificação do gene *HER2*, dos 44 casos com esta informação, 13,6% (n=6) de nossa casuística foi positiva, sendo 2 (13,4%) casos do subtipo intestinal, 3 casos (12,5%) do subtipo difuso e 1 (14,3%) do grupo “outros”. A amplificação de *HER2* foi relatada em aproximadamente 20% dos pacientes com CG avançado, além de estar associada com pior prognóstico (GRAVALOS e JIMENO 2008). O *status* de *HER2* no tumor deve ser abordado com cautela, já que sua amplificação nas células tumorais é descrita por ser altamente heterogênea (NISHIDA et al. 2015) e esta heterogeneidade dificulta determinar os pacientes que de fato podem se beneficiar da terapia-alvo. A recidiva de tumores *HER2* positivos pode conter células *HER2* negativas como o clone predominante, e da mesma forma, a amplificação pode ocorrer ao longo da evolução da doença e se tornar o clone mais abundante da doença metastática (SHODA et al. 2016).

Na **Figura 20**, apresentamos três gráficos de curvas de sobrevida em relação ao subtipo, presença de metástase e sexo. De modo geral, observamos que pacientes com tumores do subtipo difuso, metastáticos e do sexo masculino apresentaram pior prognóstico. No entanto, devemos notar que embora não tenhamos observado diferenças significativas entre as curvas ($p=0,185$, $p=0,141$ e $p= 0,239$, respectivamente), isto talvez possa ser explicado pelo pequeno número de pacientes e pelo curto tempo de seguimento dos pacientes.

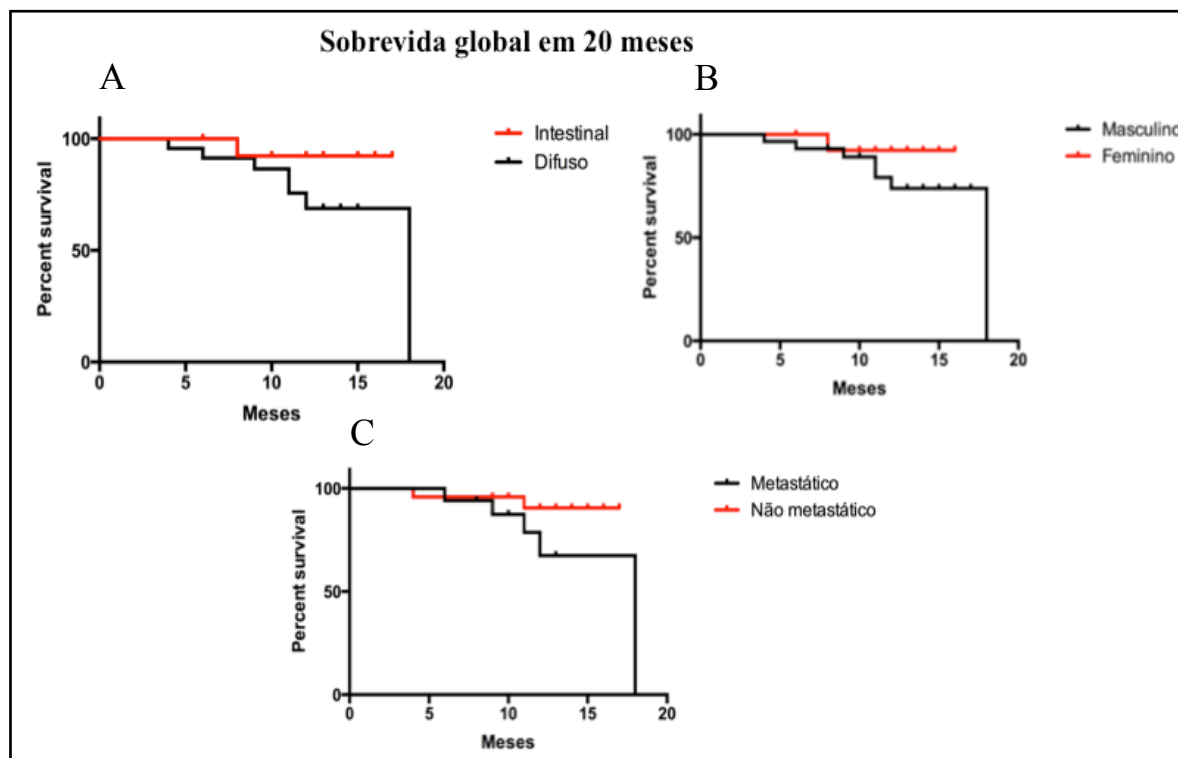


Figura 20 - Curvas de sobrevida Kaplan-Meier no contexto dos subtipos histológicos, sexo e presença de metástase. A figura A é a curva em relação ao subtipo histológico ($p=0,185$), B em relação ao sexo ($p=0,239$) e C à presença de metástase ($p=0,141$).

5.2 RESULTADOS DO SEQUENCIAMENTO DO PAINEL DE *TP53*

Os 46 casos avaliados geraram ao final um total de 246 amostras (entre lavados gástricos, biópsias dos tumores, leucócitos e plasmas) coletadas ao longo do estudo, incluindo 184 amostras obtidas antes de qualquer intervenção terapêutica e 62 amostras obtidas durante o seguimento dos pacientes (restritas a lavados gástricos e plasmas). *TP53* foi sequenciado durante o seguimento apenas para os casos cujas biópsias estavam mutadas. Dessa forma, um total de 203 amostras foram sequenciadas na plataforma *Ion Proton*, corridas em dois *chips* 318. A **Figura 21** apresenta um sumário dos dois sequenciamentos realizados:

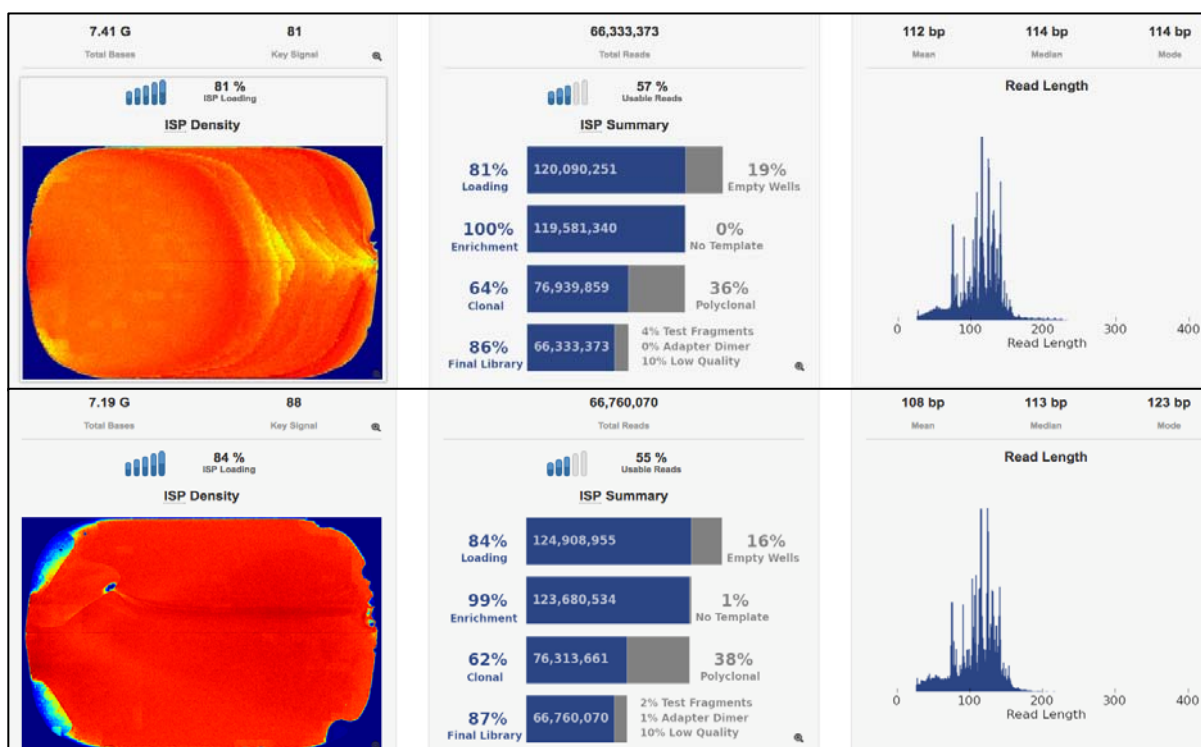


Figura 21 - Resultados gerais dos sequenciamentos. Os 2 sequenciamentos geraram 66,3 e 66,7 milhões de seqüências, cada uma com um tamanho médio de 114 e 113nt, e um total de 7,41 e 7,19 Gb de dados. Os parâmetros esperados quanto a presença de *beads* policlonais e seqüências de baixa qualidade (*Low Quality*) são respectivamente, 30% e 10%.

Ao final, geramos aproximadamente uma média de 692,7 mil *reads* por amostra em ambos sequenciamentos. As médias da cobertura vertical e *on-target* (*reads* que foram alinhados corretamente contra *TP53*) encontram-se na **Tabela 4**.

Tabela 4 - Médias da cobertura vertical e *on-target* de todas as amostra sequenciadas neste estudo.

	LG	BTPC	FFPE	Leucócitos	Plasma
Cobertura Vertical	22.000X	12.300X	8.100X	19.800X	9.200X
<i>on-target</i>	65,6%	89,9%	77,8%	91,5%	82,2%

Legenda: BTPC – Biópsia congelada obtida do tumor primário; FFPE – Biópsia parafinada do tumor primário.

Como pode-se observar, obtivemos uma boa cobertura média para todas as amostras (>8100X), e bons valores médios de *reads on-target*, que variaram de 65,6 (LG) a 91,5% (Leucócitos). As amostram de leucócitos foram utilizadas com o objetivo de filtrarmos as mutações de origem germinativa.

5.3 MUTAÇÕES EM *TP53* NO TUMOR

A partir do sequenciamento das amostras de tumor primário dos 46 pacientes selecionados, identificamos 15 casos (32,6%) com mutação em *TP53* (**Tabela 5**) (vide sessão 4.0 para definição dos critérios para a chamada de variantes). Esta pequena casuística (n=46) revelou uma frequência mutacional inferior à descrita em alguns estudos, que obtiveram

valores de 50% (n=295), e 59% (n=49) (respectivamente: BASS et al. 2014; WONG et al. 2014). No entanto, os valores que nós encontramos foram similares aos observados por outros autores tais como KAKIUCHI et al. 2014 (38%, n=138) e CRISTESCU et al. 2015 (33%, n=251). Ambos estudaram pacientes asiáticos, tendo como casuística 54,2% do subtipo intestinal e 39,3% de difuso (CRISTESCU), ou 43% do subtipo intestinal e 34% do difuso (KAKIUCHI). Já em nossa casuística, apresentou 32,6% (15/46) do subtipo intestinal e 52,2% (24/46) do difuso. Após diversas procuras em bancos de dados da literatura científica, não encontramos outros estudos que tivessem avaliado a frequência mutacional de *TP53* em pacientes brasileiros com ADG, investigando por subtipo histológico pela classificação de Lauren. SAFATLE-RIBEIRO et al. (1996), avaliaram mutações em *TP53* por sequenciamento direto (exons 5 a 8) em 14 casos de câncer de coto gástrico, encontrando uma frequência de 35,7% (5/14 casos). Um fator que pode elucidar a baixa frequência de mutação encontrada, além do nosso pequeno N amostral, é a heterogeneidade tumoral (WONG et al. 2014), que pode explicar porque as biópsias avaliadas não contenham células tumorais mutadas, que talvez pudessem estar presentes em outras porções do mesmo tumor. No entanto, alguns autores sugerem que mutações em *TP53* ocorrem precocemente na carcinogênese do CG, sendo consideradas “*driver mutations*” (TAN e YEOH 2015). Dessa forma, tais mutações deveriam estar presentes na grande maioria das células tumorais (BUSUTTIL et al. 2014). Além disto, a heterogeneidade tumoral não explica a discrepância entre os estudos, pois ela deve ser igualmente encontrada nos diversos estudos.

Deste modo, é possível que a frequência de mutações em *TP53* nos pacientes brasileiros seja inferior àquela descrita em alguns outros estudos, mas esta hipótese deve ser avaliada em futuros estudos com um número maior de pacientes.

Quando consideramos todos os nossos 15 casos mutados, vemos que 8 (53,3%) são do subtipo difuso, 6 (40%) do subtipo intestinal e 1 (6,7%) do grupo “outros”. Ao estratificarmos os casos em relação aos subtipos principais, vemos que a frequência mutacional de *TP53* foi de 40% (6/15) para o subtipo intestinal e 33,3% (8/24) para o subtipo difuso, achado alinhado com alguns trabalhos que mostram o subtipo intestinal sendo o mais mutado para este gene (ALI et al. 2015; HANAZONO et al. 2006; KAKIUCHI et al. 2014; TAHARA et al. 2014; WONG et al. 2014, BUSUTTIL et al. 2014).

Tabela 5 - Mutações em *TP53* encontradas nas biópsias de tumor aqui avaliadas.

Paciente	Coordenada genômica da mutação (cromossomo 17)	Cobertura total da base mutada	Reads contendo a mutação (N)	Reads contendo a mutação (%)	Células tumorais na biópsia (%)	Subtipo tumoral	EC
1	7577094G>A	21.637	1.638	7,57	70	Difuso	IV
2	7578503C>T	15.626	1.096	7,01	80	Difuso	III
3	7577538C>T	19.700	1.939	9,84	80	Difuso	IV
4	7578475G>A	3.983	508	12,75	50	Difuso	IIB
5	7579575G>A	308.204	29.479	9,56	90	Difuso	IV
6	7578212G>A	20.876	1.134	5,43	60	Difuso	III
7*	7577548C>G	4.022	113	2,81	80	Difuso	ND
8	7577120C>T	43.993	10.357	23,54	ND	Difuso	ND
9	7577548C>T	52.728	5.348	10,14	100	Intestinal	III
10	7577121G>A	22.118	2.362	9,64	100	Intestinal	ND
11	7577094G>A	25.295	2.250	8,90	80	Intestinal	IV
12	7577094G>A	57.113	26.065	45,63	90	Intestinal	IV
13*	7578195C>T	7.893	119	1,50	90	Intestinal	IV
14*	7578550G>A	5.208	313	6,01	90	Intestinal	III
15	7578268A>C	20.439	623	3,04	80	Outros	IB
Média		36.662	5.556	10,89	81,43		

Legenda: A tabela indica a posição da mutação no gene, cobertura vertical da base referência e da base alterada, a frequência da variante encontrada, a porcentagem de células tumorais presentes na biópsia, o subtipo tumoral, além do estadiamento clínico. *- Amostras provenientes de blocos de parafina; ND- Dado não disponível; EC-Estadiamento clínico; N- número total de *reads*.

Apesar do nosso pequeno N amostral, avaliamos possíveis diferenças na frequência mutacional de acordo com: a) subtipo histológico (difuso x intestinal x outros); b) percentual de células tumorais na biópsia (50-70% x 80% x $\geq 90\%$) e c) estadiamento tumoral (IB x IIB x III x IV x Não-informado). Porém não observamos diferenças significativa entre a quantidade de *reads* com a mutação em relação ao subtipo histológico ($p=0,599$), à quantidade percentual de células tumorais na biópsia ($p=0,438$, $p=0,481$ e $p=0,312$), ou ao estadiamento clínico ($p=0,353$). A análise usando dados de subtipo tumoral e estadiamento só foi possível na comparação entre difuso e intestinal, EC III e IV, devido a pequena amostragem.

Realizamos análises avaliando também os tipos de mutações encontradas. A **Quadro 3** mostra a localização das mutações nos exons, qual o seu tipo e qual o efeito gerado na proteína traduzida. Como pode-se observar, duas mutações (13,3%) são do tipo *nonsense* (ambas encontradas em tumores do subtipo difuso), uma única mutação (6,7%) foi do tipo silenciosa e doze mutações (80%) foram do tipo *missense*, cuja frequência está de acordo com achado de KOHNO et al. (2016). Interessantemente, a grande maioria das mutações observadas nesse estudo têm potencial deletério, de acordo com o banco do *International Agency for Research on Cancer-IARC* - Fonte: <http://p53.iarc.fr/TP53GeneVariations.aspx>). Todas as mutações se localizaram exclusivamente entre os exons 4 e 8, onde em geral se localizam as mutações mais frequentemente descritas para *TP53* (BUSUTTIL et al. 2014; TAHARA et al. 2014). Todas essas mutações, com exceção de três (7578503, 7578195 e 7579575), haviam sido previamente

descritas no banco de dados mutacionais de *TP53* para câncer de estômago no IARC (*TP53 mutations - Stomach_IARC*).

Quadro 3 - Características das mutações em *TP53* encontradas nas biópsias tumorais

Pacientes	Coordenada genômica (Cromossomo 17)	Tipo de mutação	Alteração de AA	Exon	Efeito predito
1, 11 e 12	7577094G>A	<i>Missense</i>	Arg282Trp	8	Deletéria
2	7578503C>T	<i>Missense</i>	Val143Met	5	Deletéria
3	7577538C>T	<i>Missense</i>	Arg248Gln	7	Deletéria
4	7578475G>A	<i>Missense</i>	Pro152Leu	5	Deletéria
5	7579575G>A	<i>Nonsense</i>	Gln38*	4	<i>Stop</i>
6	7578212G>A	<i>Nonsense</i>	Arg213*	6	<i>Stop</i>
7	7577548C>G	<i>Missense</i>	Gly245Arg	7	Deletéria
8	7577120C>T	<i>Missense</i>	Arg273His	8	Deletéria
9	7577548C>T	<i>Missense</i>	Gly245Ser	7	Deletéria
10	7577121G>A	<i>Missense</i>	Arg273Cys	8	Deletéria
13	7578195C>T	Silenciosa	Val218Val	6	Silenciosa
14	7578550G>A	<i>Missense</i>	Ser127Phe	5	Deletéria
15	7578268A>C	<i>Missense</i>	Leu194Arg	6	Deletéria

Legenda: *- códon de parada; aa- aminoácido

A **Figura 22**, mostra a distribuição das mutações encontradas nos domínios proteicos de *TP53*. A característica deletéria dessas mutações pode ser explicada por sua localização na região codificadora de domínios de ligação de *TP53* ao DNA, característica apontada como fator independente de pior sobrevida global (TAHARA et al. 2014; KOHNO et al. 2016b).

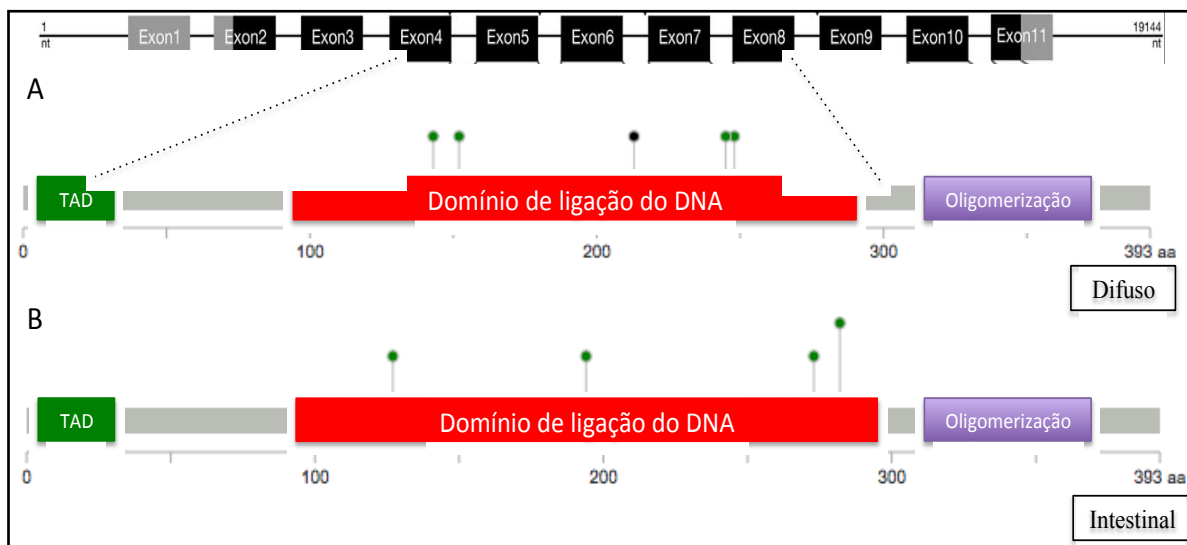


Figura 22 - Mutações distribuídas nos domínios da proteína TP53. A linha tracejada indica a extensão da região *hotspot* de mutação deste gene, do exon 4 ao 8. TAD- Domínio de ligação dos fatores de transcrição. Mutações indicadas em verde: *missense*; Mutações em preto: *Nonsense*.

Realizamos com nossos dados uma avaliação de compartilhamento de mutações, visando identificar um possível *hotspot* mutacional em nossas amostras. A única mutação que se repetiu foi na posição gênica 7577094 G>A, aparecendo com alta frequência mutacional (20% dos casos, 3/15). Além disso, sendo os subtipos difuso e intestinal considerados como dois grupos biológicos distintos (MEIRELES et al. 2004), nós realizamos ainda uma análise de compartilhamento de mutações entre ambos (**Figura 23**). Podemos observar que somente uma mutação se mostrou compartilhada por esses dois subtipos. A mutação 7577094 G>A, acima descrita, foi também a única compartilhada. Além disso, em uma outra análise que realizamos visando avaliar mutações compartilhadas em diferentes etnias, essa mutação estava compartilhada entre pacientes brasileiros provenientes

desta casuística, além de asiáticos e europeus (dados do TCGA) (BASS et al. 2014; PIZZI et al. 2016). Novamente fazendo uma ressalva devido a nossa baixa causística, podemos sugerir que esta mutação talvez esteja associada com a carcinogênese gástrica, de modo independentemente do subtipo, em diferentes grupos populacionais.

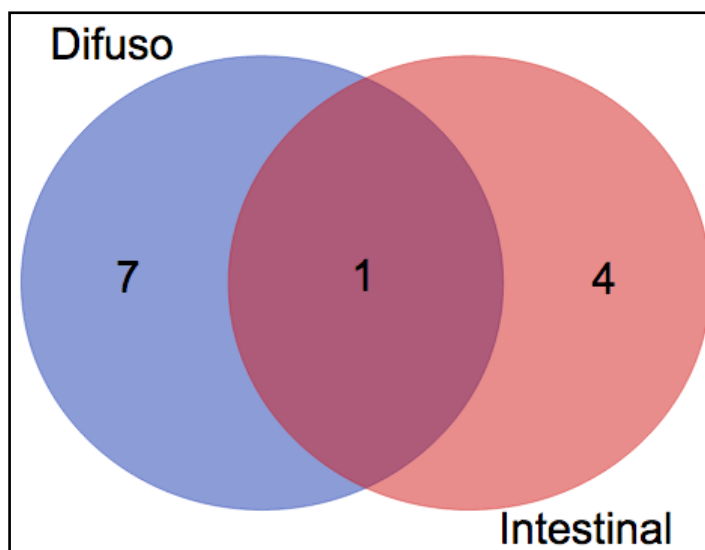


Figura 23 - Diagrama de Venn das mutações compartilhadas entre os dois subtipos histológicos.

Considerando a possível ocorrência de aspectos moleculares distintos entre ambos subtipos, realizamos uma análise a fim de verificar qual o padrão de troca de nucleotídeos entre os subtipos tumorais (**Figura 24**). Observamos que o espectro mutacional para ambos é bem parecido, tendo apenas alguns padrões de trocas de nucleotídeos exclusivas para cada subtipo. A maioria das trocas (realçadas em roxo na **Figura 24**) são transições C>T/G>A (86,67%, n=13) enquanto as transversões representam

13,33% (n=2). Esse perfil também foi visto em outros trabalhos, que descrevem as transições como sendo mais comuns no CG (GREENMAN et al. 2007; BASS et al. 2014; TAHARA et al. 2014; HU et al. 2016), com transversões ocorrendo em ~30% dos casos (YOKOZAKI et al. 1992; OKI et al. 2009).

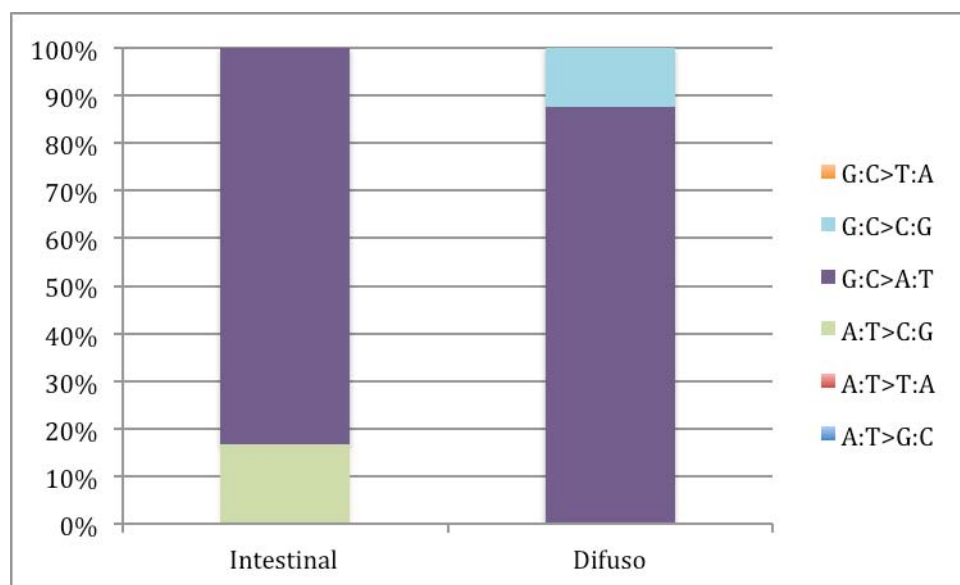


Figura 24 - Perfil mutacional de troca de nucleotídeos em *TP53*, para cada um dos dois subtipos principais de CG.

Acredita-se que as transições possam ser causadas pelo óxido nítrico (NGUYEN et al. 1992; TAHARA et al. 2014), composto cuja produção é induzida durante a infecção por *H. pylori*. Outro fator que pode induzir o mesmo padrão de troca são compostos nitrosos provenientes da dieta, como os alimentos processados que são considerados também carcinogênicos para CG (SAITO e SUGIMURA 1973). Além disso, um recente artigo analisou assinaturas gênicas de vários tipos de câncer, incluindo estômago.

Como resultado, ele obteve uma assinatura que mostrou predominância de trocas de C>T/G>A (ALEXANDROV et al. 2013a, 2015). Essa troca foi atribuída à família das citidinas deaminases AID/APOBEC (NIK-ZAINAL et al. 2012), sendo caracterizada por altas taxas de mutações de C>T e C>G (HARADHVALA et al. 2016). Ademais, um outro estudo associou essa troca com a superexpressão do RNA mensageiro que codifica as enzimas dessa família, havendo uma correlação positiva entre ambas (LI et al. 2016). Como a ativação de AID/APOBEC constitui parte da resposta imune inata à vírus e retrotransposons (KOITO e IKEDA 2013), pode ser que estas mutações representem danos causados pela própria resposta imune dirigida a esses elementos. Este padrão de mutação causada por AID/APOBEC também foi associado à infecções por *H. pylori*. Análises em ratos mostraram que a expressão de proteínas da família AID/APOBEC na presença desta bactéria, provocaram mutações no gene *TP53* idênticas àquelas relatadas em humanos (MATSUMOTO et al. 2007; SHIMIZU et al. 2014).

A confirmação desta hipótese é um importante aspecto no contexto da carcinogênese do CG causada por microorganismos. Apesar de sabermos que o vírus EBV também está associado a esta neoplasia, ainda não se sabe ao certo o mecanismo que desencadeia o início desta lesão, dessa forma, investigar esse aspecto da via AID/APOBEC poderia trazer informações importantes não só para EBV, mas em um contexto mais amplo do microbioma do estômago (ALEXANDROV et al. 2013b). Além disso, a via AID/APOBEC foi descrita por estar associada a mutações no gene *PIK3CA* (HENDERSON et al. 2014; LI et al. 2016), sendo este gene o mais mutado

em ADGs com infecção por EBV, de acordo com dados do TCGA (Bass et al., 2014). Essa assinatura também foi associada com o subtipo histológico, revelando que essa troca de C>T está enriquecida no subtipo intestinal (ALEXANDROV et al. 2015). Interessantemente, esse subtipo geralmente é mais associados a fatores ambientais, mas infelizmente não dispomos do *status* de EBV de nossa casuística.

5.4 BUSCA DE MUTAÇÕES EM *TP53* NO LAVADO GÁSTRICO

Visando avaliar a relevância do LG (LG) no contexto de biópsia líquida, sequenciamos *TP53* a partir de DNA extraído dos LG coletados durante a endoscopia, no mesmo momento em que a biópsia foi obtida para diagnóstico. Isto foi feito com o intuito de determinar o *status* de *TP53* nos LG e também para comparar os dados entre biópsias e LG. Ao invés de desenhar ensaios para mutações específicas ou avaliar apenas as amostras cujas biópsias indicaram a presença de mutações, decidimos buscar uma visão mais ampla. Assim, avaliamos todo o gene *TP53* (e não apenas as bases com indicação de mutação pelo sequenciamento da biópsia), o que poderia também sugerir uma possível heterogeneidade mutacional deste gene em ADGs. Avaliamos também amostras de LG de pacientes cujas biópsias tumorais não apresentaram indícios mutacionais, o que permitiria avaliar a eficiência dos LGs como amostra representativa da heterogeneidade tumoral como um todo.

Obtivemos LG de todas os 46 pacientes do estudo para os quais

tínhamos biópsias disponíveis. No total, encontramos 11 mutações em LG, distribuídas em 9 pacientes diferentes. Enquanto 04 mutações (36,4%) foram encontradas exclusivamente no LG, a maior parte (07 mutações, ou 63,6%) foi encontrada tanto nas biópsias, quanto no LG.

Ao sequenciarmos *TP53* em DNA derivado de LG, encontramos 9 pacientes com mutações (9/46, 19,6%), dois destes casos apresentaram mutações distintas daquelas encontradas na biópsia tumoral correspondente (paciente 7 e 13). Todas as 31 amostras negativas para mutação de *TP53* nas biópsias, também foram negativas para mutações em LG. Dentre os 15 pacientes positivos para mutação de *TP53* nas biópsias, 7 deles (46,7%) apresentaram a mesma mutação no LG, 2 apresentaram mutação distinta no LG (13,3%) e para 6 (40%) não encontramos mutação. Deste modo, para 38/46 casos (82,6%) observamos uma concordância entre biópsia e LG quando a ausência/presença de mutações específicas em *TP53*. No total, para 4 pacientes tivemos mutações exclusivamente identificadas no LG e ausentes nas biópsias (**Tabela 6**). Ao nos restringirmos aos casos com mutação observada na biópsia, vemos a detecção de mutações em LG mais elevada para o subtipo difuso 4/8 (50%) do que para o intestinal 2/6 (33,3%), sendo esta diferença não significativa ($p=0,608$). É interessante o fato de que mais mutações tenham sido encontradas no subtipo difuso, já que seu padrão de crescimento é submucoso, enquanto que o subtipo intestinal apresenta um crescimento expansivo em direção à luz do órgão. Por isso, talvez fosse esperado que uma menor quantidade de células dos tumores do subtipo difuso atingisse a luz do estômago e conseqüentemente o LG.

Em relação ao estadiamento clínico dos pacientes, a maioria era estágio III ou IV. Assim, dos 10 pacientes com este EC, 6 apresentaram mutação detectável no LG (60%) e apenas 1 caso (paciente 15 – o único caso de doença inicial com biópsia apresentando mutação em *TP53*) apresentou estadiamento clínico IB, sendo que para 2 casos (pacientes 7 e 8) não dispomos da informação sobre estadiamento. Uma de nossas hipóteses era de que o LG, estando em contato com a mucosa gástrica, poderia carrear mutações do tumor primário desde estágios iniciais da doença. Entretanto, como apenas um paciente era de estágio clínico inicial, não pudemos investigar melhor essa hipótese, mas o fato de termos encontrado a mutação no LG em nosso único caso de doença inicial, é relevante e pode indicar o potencial uso de LG em diagnóstico precoce.

Tabela 6 - Mutações observadas em biópsia e/ou no LG indicado nos dois tipos de amostra para os pacientes

Paciente	Posição genômica	Reads totais em LG	Número e (%) de reads contendo a variante no LG	Número e (%) de reads contendo a variante na biópsia	Subtipo
1	7577094G>A	9.120	106 (1,16%)	1.638 (7,57%)	Difuso
2	7578503C>T [#]	1.952	3 (0,15%)	1.096 (7,01%)	Difuso
3	7578488C>T*	24.107	448 (1,86%)*	2 (0,032%)	Difuso
	7577538C>T	48.913	899 (1,84%)	1.939 (9,84%)	
4	7578475G>A [#]	22.838	5 (0,02%)	508 (12,75%)	Difuso
5	7579575G>A [#]	689.825	1661 (0,24%)	29.479 (9,56%)	Difuso
6	7578212G>A	3.865	179 (4,63%)	1.134 (5,43%)	Difuso
7	7577548C>G [#]	13.033	1 (0,007%)	113 (2,81%)	Difuso
	7577538C>T*	13.019	2.146 (16,48%)*	4 (0,01%)	
8	7577120C>T	18.443	326 (1,77%)	10.357 (23,54%)	Difuso
9	7577548C>T	188.791	16.260 (8,61%)	5.348 (10,14%)	Intestinal
10	7577121G>A	-	BQ	2.362 (9,64%)	Intestinal
11	7577094G>A [#]	55.888	44 (0,07%)	2.259 (8,90%)	Intestinal
	7577550C>T*	3.010	31 (1,03%)*	35 (0,08%)	
12	7577094G>A	4.303	190 (4,41%)	26.065 (45,63%)	Intestinal
	7578195C>T	-	NC	119 (1,50%)	
13	7577070G>A*	9.417	307 (3,26%)*	4 (0,05%)	Intestinal
14	7578550G>A [#]	3.195	5 (0,15%)	313 (6,01%)	Intestinal
15	7578268A>C	20.655	104 (0,50%)	623 (3,04%)	Outros
Média ^a		66.493	1.908 (4,14%)**	5.557 (10,9%)**	

Legenda: a – o valor da média considera apenas os números em preto, ou seja, onde os filtros aplicados consideraram estas alterações como válidas. *- mutação considerada válida em LG porém excluída (filtrada) no sequenciamento das biópsias. # - mutação considerada válida na biópsia, porém excluída (filtrada) no sequenciamento do DNA derivado de LG; Em vermelho são indicadas as mutações (número de reads e %) consideradas não validadas em apenas um dos tipos amostrais (LG ou biópsia); BQ- Amostra de baixa qualidade no sequenciamento; NC- Região da mutação não coberta; ** indica valores de média considerando apenas os achados válidos, ou seja, após a exclusão dos valores em vermelho (que foram filtrados conforme indicado no texto).

A Tabela 6 apresenta todas as mutações em *TP53* encontradas em LG (consideradas válidas por não terem sido filtradas durante a remoção de ruídos de sequenciamento e também aquelas filtradas). Enquanto encontramos mutações em *TP53* nas biópsias de 15/46 pacientes (32,5%), no LG conseguimos encontrar mutações para 9/46 pacientes (19,56%). Cabe notar que talvez tenhamos excluído algumas mutações que poderiam

ser verdadeiras, como no paciente 5 que apresentou 1661 *reads* com a mutação (0,24%), mas não passou no filtro de ruído no contexto de trinucleotídeo. Para outros dois casos não temos dados informativos do sequenciamento de LG devido a baixa cobertura na posição da mutação (paciente 13, base 7578195) ou à baixa qualidade do sequenciamento (paciente 10, base 7577121). Assim, talvez nossos dados quanto à validade do LG estejam um pouco subestimados.

Além das mutações compartilhadas com as biópsias, encontramos novas mutações, achadas exclusivamente no LG, sugestivo de heterogeneidade tumoral e da ocorrência de múltiplos clones com distintas mutações neste gene. Isto faz que, para 4 casos, tenhamos encontrado duas mutações diferentes para um mesmo paciente. É importante ressaltar que essas mutações (marcadas na tabela com um asterisco) foram observadas em baixa frequência nas biópsias, porém foram excluídas das mesmas (filtradas) ao não passarem pelos filtros de ruídos, conforme apresentado anteriormente. Interessantemente, mesmo após excluirmos algumas mutações que não passaram em nossos filtros, a mutação 7577538 C>T encontrada exclusivamente no LG do paciente 7 foi a mutação com a maior frequência encontrada (16,48%) neste fluido. Sendo esta frequência maior até mesmo do que aquelas mutações também encontradas nas biópsias, o que reforça que talvez este achado seja real. Além disso, para este paciente, a cobertura desta base no sequenciamento da biópsia foi alta (4021 *reads*). No entanto, apenas 04 *reads* (0,01%) indicavam esta mesma mutação,

fazendo com que a mesma fosse excluída por estar em uma frequência muito baixa.

É de interesse notar que esta mesma mutação foi também observada no tumor primário e no LG de outro paciente (paciente 3), e é descrita como um *hotspot* em *TP53* e um possível marcador de pior prognóstico em ADG (TAHARA et al. 2014).

Neste ponto, podemos ser apenas especulativos e sugerir algumas hipóteses para as mutações exclusivas de LG. Estas possibilidades incluem: i) Estas mutações podem ocorrer em outra área da mucosa gástrica, que não tenha sido biopsiada, ii) podem ainda ocorrer em área onde não existe tumor mas sim um campo de cancerização ou lesões com potencial de malignização, tais como gastrite, metaplasia e displasia, já que é descrito que mutações no gene *TP53* podem ser encontradas antes do surgimento do tumor (BUSUTTIL et al. 2014). Assim, estas mutações talvez não tenham uma origem propriamente neoplásica; iii) outra possibilidade é que essas mutações possam ter vindo de células derivadas de outras áreas do trato digestivo superior, sendo originadas em outras células tumorais/pré-tumorais de outras regiões; iv) certamente não podemos descartar que estas mutações sejam fruto de heterogeneidade tumoral (WONG et al. 2014), sendo derivadas de clones de células tumorais que talvez não sejam os clones predominantes ou talvez nem mesmo estejam presentes na amostra da biópsia; v) Para algumas variantes com baixa frequência, como no paciente 12 (31 *reads*, 1,03%), não podemos descartar erro de sequenciamento, apesar de termos aplicado filtros rigorosos durante análise

bioinformática. Para investigar melhor esta questão, realizamos uma validação técnica em algumas amostras, onde sequenciamos o DNA em uma outra plataforma e utilizando uma abordagem distinta para a seleção das moléculas representativas deste gene (vide sessão 3.8)

Como anteriormente descrito, o tipo e efeito das mutações exclusivas de LG também foram avaliados e vemos padrão similar de localização (entre exons 4 e 8) e com predominância de alterações deletérias (**Quadro 4**).

Quadro 4 - Potencial impacto das mutações encontradas apenas no LG (não observadas nas biópsias)

Paciente	Posição genômica	Tipo de mutação	Troca de aa	Localização	Efeito
3	7578488C>T	Mutação <i>Missense</i>	Asp148Asn	Exon 5	Neutra
7	7577538C>T	Mutação <i>Missense</i>	Arg248Gln	Exon 7	Deletéria
12	7577550C>T	Mutação <i>Missense</i>	Gly244Asp	Exon 7	Deletéria
13	7577070G>A	Mutação <i>Missense</i>	Arg290Cys	Exon 8	Deletéria

Legenda: aa- aminoácido

A partir desses resultados, podemos sugerir que o LG pode refletir o *status* mutacional do tumor, ou mesmo de outras condições patológicas do estômago (HÅKANSON et al. 1967; WU e CHUNG 2013). O íntimo contato entre o LG e o tecido gástrico como um todo (seja ele normal ou neoplásico), faz com que este seja uma fonte de valiosos biomarcadores, que pode conter informações moleculares de diversos estágios da progressão da doença (WU e CHUNG 2013).

Até hoje, os trabalhos que avaliaram o valor do LG para a busca de biomarcadores são muito escassos. WATANABE et al. (2009), ao avaliarem 20 pacientes com ADG, encontraram uma deleção específica do gene *TP53*,

tanto no tumor primário quanto no respectivo LG de um caso. Diferente do nosso trabalho, estes pesquisadores utilizaram o método de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), amplificando do exon 4 ao 10, e seguiram para o sequenciamento direto, buscando um evento de deleção. Ademais, os autores também encontraram uma boa correlação entre metilação do DNA derivado da biópsia do tumor primário e LG. Em nosso trabalho, avaliamos esta questão com uma abordagem mais moderna e sensível e com uma casuística bem maior, onde observamos uma maior taxa de detecção de alterações. A pesquisa de metilação no gene *CDH1* em 20 pacientes com ADG no subtipo difuso entre tumor e LG resultou em uma taxa de detecção de 65% (MURETTO et al. 2008). Além disso, foi descrita uma boa taxa de detecção de *H. pylori* (KUO et al. 2016) e do marcador tumoral CA 72-4 em LG, em níveis comparáveis aos detectados no soro (HUANG et al. 2013).

Outros autores usaram o LG desta vez na busca de miRNAs com potencial de biomarcadores do CG, onde observaram correlações positivas entre a biópsia e o LG (CUI et al. 2013a). Deste modo, os poucos estudos publicados, aliados ao trabalho aqui apresentado mostram a viabilidade do uso do LG de forma a acessar alterações tumorais em DNA e miRNA. Já que o exame endoscópico, momento de coleta do LG, é procedimento fundamental na rotina do monitoramento de queixas gástricas, isto faz com que a sua coleta não represente riscos maiores ou procedimentos extras, e configuram o LG como material promissor no diagnóstico e monitoramento

de pacientes, e com potencial para avaliar a recorrência tumoral e resposta ao tratamento.

5.5 ANÁLISE DE MUTAÇÕES EM *TP53* ENCONTRADAS NO PLASMA

Para analisar o real valor do LG neste cenário, é fundamental comparar estes dados aos resultados obtidos a partir da avaliação do plasma, o material usado na maioria dos trabalhos de biópsia líquida. Buscando realizar análises comparáveis, contrastamos os dados de LG com dados de plasma obtidos a partir dos mesmos casos e coletados no mesmo momento.

Ao sequenciarmos *TP53* em DNA derivado do plasma, encontramos 6 pacientes com mutações (6/46, 13%). Todas as mutações observadas no plasma concordaram com as mutações observadas nas biópsias e todas as 31 amostras negativas para mutação de *TP53* nas biópsias, também foram negativas para mutações no plasma. Deste modo, dentre as 15 amostras positivas para mutação de *TP53* em biópsia, 6 (40%) apresentaram a mesma mutação em plasma. As mutações encontradas exclusivamente no LG não foram observadas no DNA derivado do plasma. Deste modo, para 37/46 casos (80,4%) observamos uma concordância entre biópsia e plasma quando a ausência/presença de mutações específicas em *TP53*.

A taxa de detecção em ctDNA aqui descrita (40%) foi comparável à observada para CG em um trabalho recente que avaliou 94 pacientes com

mutação no tumor primário, usando a metodologia de MassARRAY iPLEX, onde os autores observaram uma taxa de 34% de detecção de ctDNA (FANG et al. 2016).

Dentre os pacientes com mutação detectada no plasma, a maior parte apresentava tumores do subtipo difuso (4/6). Se consideramos todos os tumores positivos para mutação em *TP53* na biópsia, vemos que os do subtipo difuso tiveram maior sucesso de detecção no plasma (difuso: 4/8, 50% x intestinal: 2/6, 33,3%), sendo esta diferença não significativa ($p=1.00$). A **Tabela 7** mostra os pacientes com as mutações detectadas em plasma, para cada subtipo histológico. A quantidade de *reads*/frequência da mutação das amostras de plasma que foram filtradas estão na **Tabela 9**.

Tabela 7 - Mutações de *TP53* encontradas no plasma

Paciente	Posição genômica	Cobertura total	Cobertura da Variante	Variante %	Subtipo
1	7577094G>A	14.867	2.141	14,40	Difuso
2	7578503C>T	22.011	227	1,03	Difuso
4*	7578475G>A	7.851	236	3,00	Difuso
6	7578212G>A	53.673	1.361	2,53	Difuso
9	7577548C>T	9.379	121	1,29	Intestinal
12	7577094G>A	65.174	48.040	73,71	Intestinal
Média		28.825	8.687	16%	

Para todas as amostras de plasma partimos de um volume de 5ml de plasma, usando 20ng de DNA para a geração da biblioteca (com exceção do paciente 6 e 9 que conseguimos somente 13 ng). *- indica amostra com hemólise. Legenda: D- tumor do subtipo difuso; I- tumor do subtipo intestinal;

Em relação ao estadiamento destes pacientes, nossos resultados corroboram os dados da literatura que mostram maiores taxas de detecção

de ctDNA para pacientes com estágios mais avançado da doença (KIM et al. 2014). Os pacientes 1, 2, 6, 9 e 12 são de estadiamento clínico III e IV, enquanto o paciente 4 tem o estadiamento clínico IIB, com vários linfonodos comprometidos detectados após intervenção cirúrgica. Dessa forma, dos 15 pacientes com mutação na biópsia, 10 eram de EC III ou IV e destes 5 (50%) também foram detectadas no plasma. Somente o paciente 4 tinha o estadiamento II. Além disso, o paciente 12 (que apresentou o maior percentual de mutações em todo o estudo), já apresentava doença metastática ao diagnóstico, quando fizemos a coleta das amostras. A frequência desta mutação foi de 45,63% no tumor, 4,41% no LG e 73,71% no plasma, o que possivelmente indica a transição de uma doença localizada para uma doença metastática/sistêmica. Cabe ainda notar que este é um caso de ADG intestinal, cuja disseminação é preferencialmente hematogênica (GRABSCH e TAN 2013).

De modo relevante no contexto da biópsia líquida, o número de células tumorais circulantes, necrose tumoral e apoptose são maiores nos estágios clínicos III e IV. Ademais, acredita-se que a menor quantidade de ctDNA nos estágios iniciais da doença, deve-se ao fato de tumores menores serem menos invasivos e portanto liberarem menor quantidade de DNA tumoral no plasma. Por outro lado, os estágios mais avançados possuem maior invasão linfovascular (FANG et al. 2016). Já que métodos sensíveis, baseados em sequenciamento em larga escala e com alta cobertura, não são comumente empregados, muitas vezes as mutações em baixa frequência podem estar sendo filtradas por critérios de análise restritivos,

estabelecidos com o intuito de eliminar erros de sequenciamento (CHAN et al. 2013). A determinação da cobertura vertical ideal em análises mutacionais ainda não foi estabelecida e, cabe notar que mesmo em nosso estudo, após a aplicação de alguns filtros, algumas mutações potencialmente interessantes, mas com frequências muito baixas, foram excluídas.

Cabe ressaltar que em todas as análises feitas em nosso estudo utilizamos uma massa de 20ng de DNA (exceto para as amostras de plasma dos pacientes 6 e 9 onde a quantidade disponível de material foi de apenas 13ng). Deste modo, sabendo-se que a massa de DNA de uma célula humana é de cerca de 6.6 picogramas, em todas as nossas análises analisamos o equivalente ao conteúdo mutacional de 3 mil células (ou cerca de 2 mil células onde tivemos quantidade limitante de DNA), o que permite uma visão quantitativa da presença do DNA dentro deste limite. Além disso, em algumas amostras houve hemólise e não sabemos até que ponto isto talvez possa influenciar na sensibilidade de detecção no plasma. Um dos pacientes negativos para a detecção de mutação no plasma apresentava estágio inicial da doença, momento em que talvez a carga mutacional seja limitante para ser detectável no plasma.

Além das hipóteses citadas, temos ainda a questão de heterogeneidade tumoral. A mutação no gene *TP53* pode não ser a mais abundante no tumor como um todo, apesar dos eventos mutacionais neste gene serem descritos desde estágios iniciais da tumorigênese (BUSUTTIL et al. 2014). Além disso, a região do tumor que é mais irrigada e que pode

contribuir mais intensamente com a carga de ctDNA plasmático, pode não conter os clones de *TP53* mutado entre os mais abundantes, o que diminuiria sua sensibilidade de detecção no plasma.

Poucos trabalhos foram realizados avaliando ctDNA em câncer gástrico. Entretanto, estes demonstraram uma perspectiva favorável. Em 2014, KIM et al. (2014) viram que níveis de DNA livre no plasma parecem não variar de acordo com o subtipo histológico, mas têm relação direta com o tamanho do tumor, invasividade e estágio da doença. Interessantemente, esses autores verificaram que enquanto o estudo de ctDNA ofereceu achados consistentes, alguns marcadores tumorais mais clássicos em CG (como CEA e CA19-9) não demonstraram estar associados com progressão e estadiamento. Estes achados corroboram outros estudos que sugerem que a sensibilidade destes marcadores é inferior a detecção obtida com o ctDNA (DIEHL et al. 2008; DAWSON et al. 2013; HAMAKAWA et al. 2014; KIM et al. 2014; FANG et al. 2016) e também se aplica a outras neoplasias, tais como tumores de cólon, tumores renais, entre outros (BETTEGOWDA e SAUSEN 2014). Destaca-se ainda que os tumores gastroesofágicos apresentam a terceira menor taxa de detecção de ctDNA dentre diversos outros tumores humanos (BETTEGOWDA e SAUSEN 2014), o que corrobora as baixas taxas de detecção de ctDNA em CG.

Um estudo recente, semelhante ao nosso, avaliou mutações no gene *TP53* em pacientes com CG e rastrearam a mesma mutação no plasma por sequenciamento de nova geração. Como resultado eles observaram 10/42 (24%) pacientes com mutação no tumor primário. Destes 10 pacientes,

apenas 3 apresentaram mutação no plasma (30%), sendo esta frequência inferior à nossa (40%), mesmo com uma amostragem semelhante. Entretanto, eles também foram bastante restritivos neste estudo, utilizando como valor de corte a quantidade de >100 000 *reads* por variante e, como ruído, consideraram a frequência de mutação observada nos leucócitos do mesmo caso. Em nossa análise identificamos pelo menos duas falhas nesta abordagem: a) ela se baseia em uma cobertura estanque em todas as amostras, sem um critério estatístico; b) ela não considera que diferentes tecidos geram diferentes ruídos mutacionais (tal como fizemos em nosso estudo) e c) ela desconsidera que, com uma alta cobertura vertical no sequenciamento, podemos capturar potenciais *Circulating Tumor Cells* (CTCs) durante o sequenciamento dos leucócitos.

No entanto, um aspecto interessante deste trabalho, foi a análise concomitante de níveis de ctDNA e DNA total livre na circulação, demonstrando que concentrações de ctDNA apresentavam boa correlação com a dinâmica tumoral, mas isso não se aplicava para o DNA total livre no plasma (HAMAKAWA et al. 2014). Apesar disso, os autores demonstraram que as concentrações de DNA livre para pacientes com gastrite atrófica e metaplasia intestinal eram significativamente maiores do que para controles sem doença. Imaginaríamos então, que a concentração de DNA total livre no plasma pudesse indicar alguma anormalidade, mas não corresponde necessariamente a aspectos intrínsecos do tumor (KIM 2012).

Outro aspecto importante da biópsia líquida foi destacado por SHODA et al. 2016. Os autores investigaram níveis de amplificação de *HER2* no

plasma usando PCR digital, no momento da recorrência tumoral. Eles verificaram que 7 (53,8%) pacientes dos 13 *HER2*-negativos no tumor primário, apresentaram positividade para a amplificação no plasma. Sugerindo que a população clonal dos pacientes com ADG durante a recorrência, tenha se alterado, indicado pelo aumento de clones com amplificação de *HER2*. Isso nos mostra que em alguns casos pode haver uma grande heterogeneidade intratumoral e que mecanismos intrínsecos e extrínsecos podem levar a uma flutuação na composição destes clones. Este estudo realçou, mais uma vez, a importância da biópsia líquida no seguimento dos pacientes.

5.6 ANÁLISE COMPARATIVA DAS MUTAÇÕES ENCONTRADAS

A partir da análise das mutações encontradas para cada paciente, em todas as amostras (biópsia, LG e plasma), construímos a **Tabela 8** a fim de reunir e permitir a comparação das mutações encontradas nos dois fluídos. Uma análise combinada dos dados de LG e plasma mostra que, se avaliados em conjunto, estes dois componentes permitem identificar mutações tumorais para 9/15 pacientes, um índice de 60%, que é superior a alguns trabalhos descrito para biópsias líquidas baseadas apenas em plasma em CG. Devemos considerar ainda que talvez este valor esteja subestimado, pois tivemos problemas técnicos que impediram a análise de duas mutações no LG (como discutido anteriormente).

Tabela 8 - Mutações encontradas no LG e plasma.

Paciente	Subtipo	Células tumorais na biópsia (%)	Mutação no tumor	Percentual de reads indicando a variante		
				Biópsia (%)	LG (%)	Plasma (%)
1	D	70	7577094G>A	7,57	1,16	14,40
2	D	80	7578503C>T	7,01	0	1,03
3	D	80	7577538C>T	9,84	1,83	0
4	D	50	7578475G>A	12,75	0	3,00
6	D	60	7578212G>A	5,43	4,63	2,53
8	D	NI	7577120C>T	23,54	1,76	0
9	I	100	7577548C>T	10,14	8,61	1,29
12	I	90	7577094G>A	45,63	4,41	73,71
15	O	80	7578268A>C	3,04	0,5	0
5	D	90	7579575G>A	9,56	0	0
7	D	80	7577548C>G	2,81	0	0
10	I	100	7577121G>A	9,64	NA	0
11	I	80	7577094G>A	8,90	0	0
13	I	90	7578195C>T	1,50	NA	0
14	I	90	7578550G>A	6,01	0	0
Média				10,5	22,5	16

Legenda: Os pacientes destacados em cinza são aqueles cujas mutações foram detectadas em LG ou plasma. D- Difuso; I- Intestinal; O-Outros; NA- Não avaliado devido a problemas técnicos de baixa cobertura da base mutada ou baixa qualidade do DNA disponível.

Além disso, avaliamos a presença/ausência da mutação para cada fluido e também para a combinação deles, em comparação com as mutações encontradas nas biópsias dos tumores primários (**Quadro 5**).

Quadro 5 - Descrição das mutações em *TP53* por tipo de amostra.

		LG			Plasma			LG + Plasma		
		WT	Mut	Total	WT	Mut	Total	WT	Mut	Total
Biópsia	WT	0	4	4	0	0	0	0	4	4
	Mut	8	7	15	9	6	15	6	9	15

Legenda: WT- Gene selvagem (sem mutação); Mut- Mutado

Em vista disso, avaliamos a partir de um diagrama de Venn quantas mutações eram compartilhadas entre o plasma e o LG, e sua relação com as mutações observadas na biópsia. De nosso total de 15 pacientes positivos para mutação em *TP53* na biópsia, encontramos 7 deles com mutação detectada no LG (46,7%), 6 com mutação positiva no plasma (40%) e 4 pacientes com mutações encontradas em ambos (26,7%) (**Figura 25a**). Se consideramos todas as mutações, independente das mesmas terem sido observadas na biópsia original, vemos um total de 9 pacientes positivos em LG (11 mutações) e 6 pacientes positivos em plasma (6 mutações) (**Figura 25b**). Assim, observamos um maior número de mutações no LG (associadas ou não ao tumor) enquanto que no plasma só vimos mutações também detectadas no tumor primário.

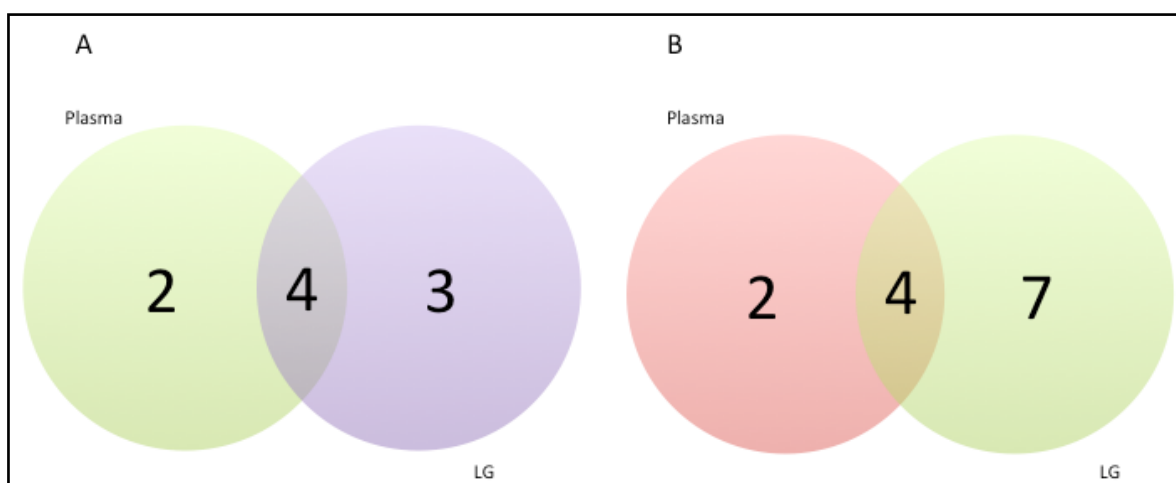


Figura 25 - Diagrama de Venn das mutações detectadas no LG e plasma. (A)- Mutações detectadas na biópsia e confirmadas em LG e plasma. B- Sobreposição de todas as mutações encontradas em ambos LG e plasma.

Na **Figura 26**, nós analisamos todas as amostras juntas para avaliarmos quantas mutações distintas eram compartilhadas entre elas, o que reflete o que discutimos acima.

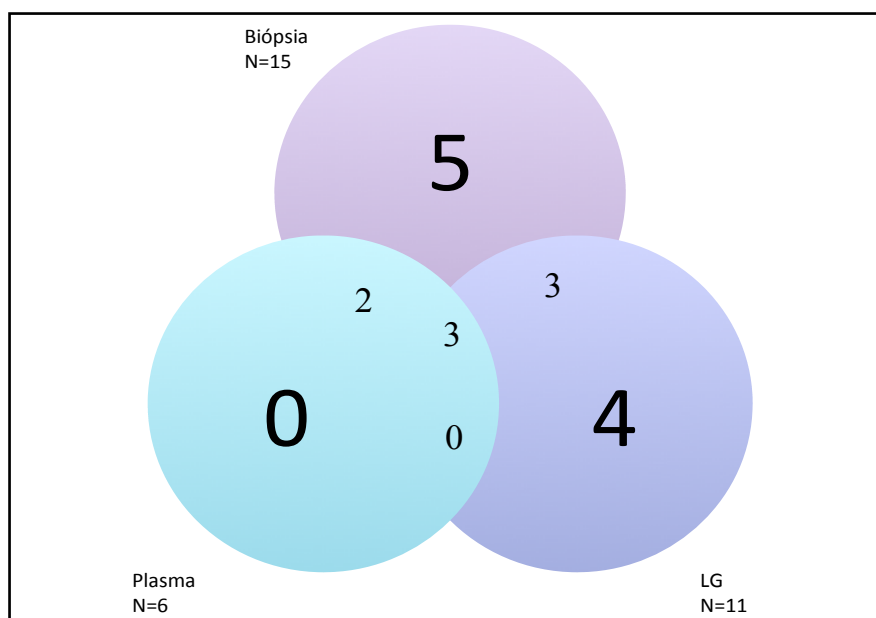


Figura 26 - Diagrama de Veen apresentando o compartilhamento entre as mutações distintas(únicas) detectadas no LG, plasma e tumor.

Também investigamos a correlação de cada fluído em relação ao tumor, a fim de especular qual fluído representaria melhor, em termos quantitativos, a carga mutacional de *TP53* presente na biópsia. (**Figura 27**).

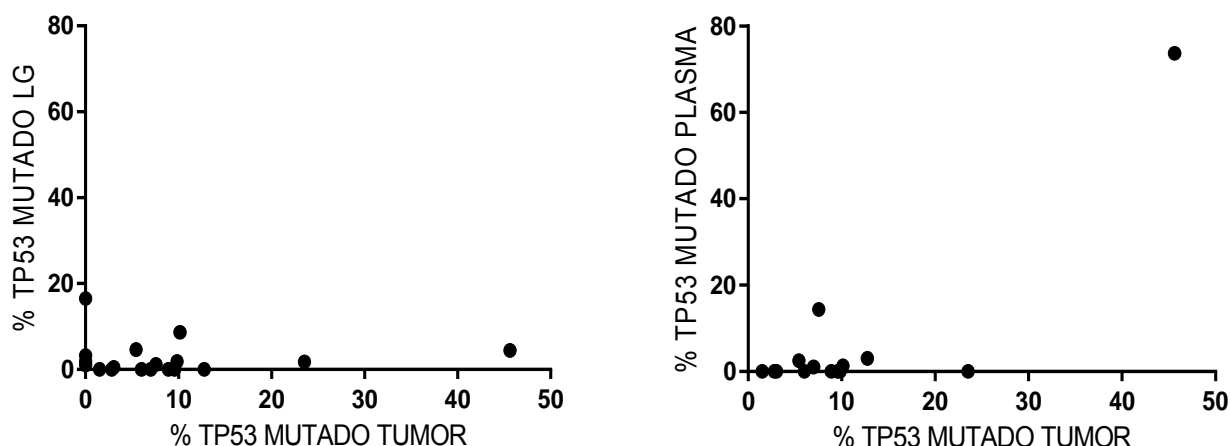


Figura 27 - Correlação entre tumor e LG, tumor e plasma. R= coeficiente de correlação sendo significativo se $p < 0,05$. Como resultado da correlação de Spearman no Plasma: $R=0,35$ e $p=0,20$; No LG, $R: -0,067$ e $p=0,97$.

Na análise de correlação entre o tumor e cada fluido separadamente, nós não encontramos uma correlação significativa entre nenhum deles, acreditamos no entanto que este resultado foi influenciado pelo nosso pequeno N amostral. Entretanto, se traçarmos uma reta fazendo 45 graus em cada eixo, nós conseguimos visualizar em ambos os gráficos uma correlação entre algumas amostras de plasma e LG com o tumor. Nos achados da literatura, a correlação entre tumor e plasma já foi avaliada, tendo como resultado que o ctDNA pode representar a carga tumoral presente no tumor (ESPOSITO et al. 2014; HAMAKAWA et al. 2014; SHODA et al. 2016). Porém, o mesmo ainda não foi avaliado para o LG. Tendo em vista nossos resultados globais, temos uma boa taxa de detecção no plasma, superior à alguns dos estudos da literatura. Vemos ainda taxas de detecção ainda mais altas no LG. Neste material, observamos 46,7% de detecção quando consideramos o estudo como um todo, mas chegamos a 53,9% se

considerarmos apenas as 13 mutações encontradas na biópsia e que puderam ser avaliadas em LG (levando à identificação de 7 mutações em 13 casos avaliados em LG).

5.7 ANÁLISE DAS MUTAÇÕES DOS PACIENTES APÓS TRATAMENTO

Para os 46 pacientes deste estudo, coletamos amostras após o tratamento quimioterápico ou cirúrgico para 31 casos (67,4%). Entretanto, apenas para 6 destes pacientes (pacientes 3, 4, 5, 9, 14 e 15) havíamos detectado mutações em *TP53* na análise de biópsia do tumor primário. Destes seis casos, apenas dois (pacientes 3 e 4) tiveram mutações detectáveis no plasma ou LG após a terapia. A **Figura 28**, ilustra a frequência das mutações destes pacientes, encontradas nas diferentes amostras, antes e após o tratamento quimioterápico neoadjuvante. A **Tabela 14** ilustra as mutações encontradas antes e depois do tratamento para os 15 pacientes. Além disso, a tabela também mostra as mutações filtradas de cada paciente.

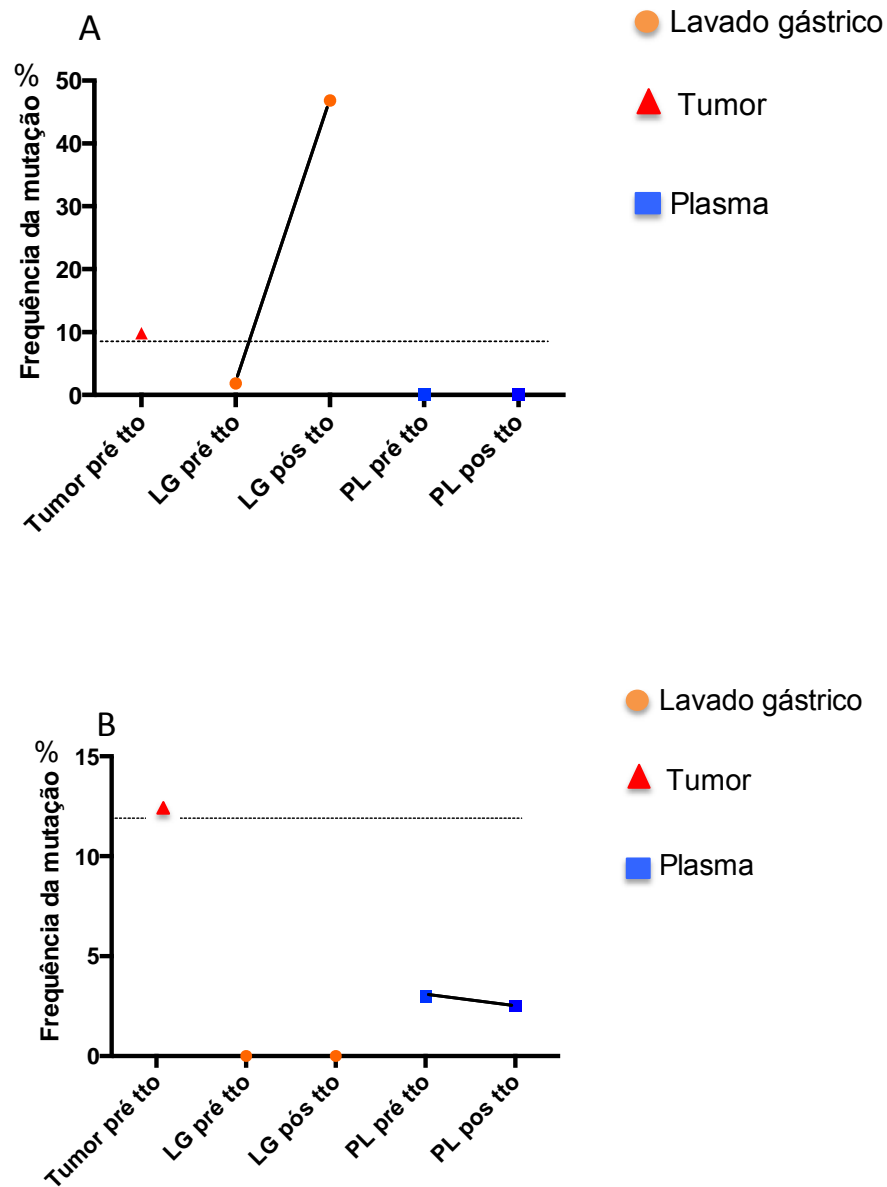


Figura 28 - Dinâmica das mutações pré e pós tratamento. A figura **28A** representa o paciente 3 e a figura **28B** o paciente 4. Tto – Tratamento; LG- LG; PL- Plasma. A linha tracejada indicada a frequência da mutação no tumor.

Tabela 9 - Descrição das mutações em *TP53* em todos os pacientes, antes e depois do tratamento, incluindo as mutações filtradas.

Paciente	Posição Gênômica	Freq da Mut no T	Freq da Mut no LG 1	Freq da Mut no PL 1	Freq da Mut no LG 2	Freq da Mut no PL 2
1	7577094 G>A	1638 (7,57%)	106 (1,16%)	2141 (14,40%)	SS	SS
2	7578503C>T	1096 (7,01%)	3 (0,15%)*	227 (1,03%)	SS	SS
3	7577538C>T	1939 (9,84%)	899 (1,83%)	2 (0,02%)*	19603 (46,83%)	3 (0,03%)*
	7578488C>T	2 (0,032%)*	448 (1,85%)	7 (0,01%)*	27 (0,1%)*	3 (0,05%)*
4	7578475G>A	508 (12,75%)	5 (0,02%)*	236 (3,00%)	12 (0,12%)*	14701(2,50)
5	7579575G>A	29479 (9,56%)	1661 (0,24%)*	8 (0,05%)*	79 (0,06%)*	103 (0,09%)*
6	7578212G>A	1134 (5,43%)	179 (4,63%)	1361 (2,53%)	SS	SS
7	7577548C>G	113 (2,81%)	1 (0,007%)*	2 (0,005%)*	SS	SS
	7577538C>T	4 (0,001%)*	2146 (16,48%)	54 (0,14%)*	SS	SS
8	7577120C>T	10357 (23,54%)	326 (1,76%)	23 (0,03%)*	SS	SS
9	7577548C>T	5348 (10,14%)	16260 (8,61%)	121 (1,29%)	25 (0,06%)*	3 (0,03%)*
10	7577121G>A	2362 (9,64%)	BQ	17 (0,09%)*	SS	SS
11	7577094G>A	2250 (8,90%)	44 (0,07%)*	11 (0,1%)*	SS	SS
12	7577094G>A	57113 (45,63%)	190 (4,41%)	48040 (73,71%)	SS	SS
	7577550C>T	35 (0,08%)*	31 (1,02%)	4 (0,015%)*	SS	SS
13	7578195C>T	119 (1,50%)	NC	28 (0,06%)*	SS	SS
	7577070G>A	4 (0,05%)*	307 (3,26%)	36 (0,05%)*	SS	SS
14	7578550G>A	313 (6,01%)	5 (0,15%)*	63 (0,18%)*	ND	36 (0,14%)*
15	7578268A>C	623 (3,04%)	104 (0,50%)	20 (0,09%)*	ND	4 (0,02%)*

Legenda: Mut- Mutação; Freq- Frequência; T- Biópsia tumoral; LG- LG; LG1- LG pré tratamento; LG 2- LG pós tratamento; C- Concentração; PL- Plasma; PL1- Plasma pré tratamento; PL 2- Plasma pós tratamento; SS- Sem seguimento; Mutações em vermelho- Aquela encontrada exclusivamente no LG; *- Mutações filtradas; BQ- Amostra de baixa qualidade no sequenciamento.

Ao analisarmos os dados destes pacientes em maior detalhe, vemos que o **paciente 3** apresentou um tumor de TEG (transição gastresofágica), HER2 positivo e metastático (EC IV) já ao diagnóstico. Além disso, durante o tratamento este paciente foi diagnosticado com um segundo tumor primário também metastático para os linfonodos e região sacral, desta vez no pâncreas. Em nossas análises este paciente apresentou um aumento significativo na frequência da sua variante mutada no LG, passando de 1,84% para 46,8% no segundo ponto de coleta, 6 meses após o diagnóstico e após 5 ciclos de quimioterapia. O gene *TP53* representa o segundo gene mais mutado em adenocarcinomas de pâncreas em uma extensa análise com 456 pacientes analisados (BAILEY et al. 2016) É difícil a interpretação de resposta ao tratamento, tendo em vista a existência simultânea de dois tumores primários ocorrendo em dois diferentes órgãos, e o paciente não ter realizado cirurgia para podermos avaliar a peça cirúrgica. Entretanto, é fato o péssimo desfecho do paciente, que veio a falecer após 11 meses após o diagnóstico. A cobertura vertical da variante no sequenciamento nos dois momentos foi bastante alta (>40.000X), o que nos dá segurança de afirmar que a carga mutacional foi de fato maior após o tratamento. Cabe ainda notar que não encontramos outras mutações no plasma (sugerindo a ausência de mutações originadas do tumor de pâncreas) e que a mutação observada no LG deve ser mesmo derivada do tumor primário, pois a mesma mutação foi encontrada e em uma frequência ainda mais elevada no momento da segunda coleta. Como foi possível ver na **Tabela 9**, este paciente apresentou uma segunda mutação encontrada exclusivamente no

LG (448 *reads*-1,85%), sendo filtrada no plasma pré-tto (7 *reads* -0,01%), na biópsia (2 *reads* -0,032%), no PL pós-tto (3 *reads*- 0,05%) e LG pós-tto (27 *reads*-0,1%). Esta mutação não foi vista no segundo ponto de coleta (LG2) o que pode sugerir que os clones carregando esta mutação tenham sido afetados pela quimioterapia.

Já o **paciente 4** apresentava, ao diagnóstico, estadiamento clínico IIB e uma frequência mutacional de 12,75% na biópsia. Esta mutação não foi considerada validada no LG pré-tratamento (5 *reads*, 0,02%) e nas análises de plasma a frequência desta mutação não teve variação importante ao compararmos os períodos pré- e pós-tratamento quimioterápico (3% e 2,5%, respectivamente - com coberturas verticais no sequenciamento de 7.000X e 58.000X, respectivamente) - sugerindo uma ausência de resposta à quimioterapia neoadjuvante. De fato, podemos concluir que este paciente não respondeu ao tratamento quimioterápico, já que a peça cirúrgica indicou evolução da doença com o estadiamento patológico classificado como ypT2ypN3yMx com grande volume de doença residual. Além disso, haviam 21 linfonodos comprometidos dos 49 dissecados. Assim, a doença progrediu ainda durante o curso da quimioterapia adjuvante e o paciente faleceu após 11 meses da data do diagnóstico. A amostra de LG obtida no pós-tto deste paciente apresentou 12 *reads* com esta mesma mutação (0,12%), mas a mesma foi filtrada.

Os dois casos apresentavam estadiamentos diferentes (ECIV x ECIIIB) e ambos apresentaram progressão da doença na vigência da quimioterapia neoadjuvante, indicando que o tDNA conseguiu refletir a dinâmica tumoral.

Infelizmente, devido ao curto período do mestrado, nossa casuística não pôde incluir outros casos, principalmente daqueles pacientes que responderam ao tratamento, além da análise de coletas de amostras de LG e plasma em diferentes momentos. Porém, nossos resultados mostram que é possível encontrar tDNA no plasma e no LG, antes e após o tratamento. Ademais, este projeto é o primeiro a utilizar o LG neste contexto e mostrar que sua taxa de detecção se equipara àquela observada no plasma.

Para os 4 pacientes que também tínhamos seguimento e apresentaram mutações de *TP53* na biópsia, mas com ausência de detecção no plasma e no LG no segundo ponto de coleta (pacientes 5, 9, 14 e 15), também fizemos uma análise do *status* da doença após o tratamento. O paciente 9 parece ter respondido bem ao tratamento quimioterápico, visto que ele foi classificado com estadiamento clínico III ao diagnóstico e após a cirurgia ele apresentou estadiamento patológico ypTisypN0ypMx, com apenas 5% de células tumorais viáveis na peça cirúrgica. Além disso, não havia invasão vascular, linfática, perineural e nenhum linfonodo comprometido dos 43 dissecados. Este paciente fez um ciclo de quimioterapia adjuvante e está fazendo seguimento sem tratamento no momento.

O paciente 14 não respondeu ao tratamento quimioterápico, dado que ele foi classificado com estadiamento clínico III ao diagnóstico e após a cirurgia ele apresentou estadiamento patológico ypT4aypN1ypMx com grande volume de doença residual, apresentando 85% de células tumorais viáveis na peça cirúrgica, invasão vascular e linfática presente e 2 linfonodos

comprometidos de 13 ressecados. O paciente apresentou após a cirurgia metástases peritoniais em alças jejunais e ileais e segue fazendo tratamento adjuvante.

O paciente 15 também não respondeu ao tratamento. Ele tinha o estadiamento clínico IB (T2N0M0, ou T1N0M0) ao diagnóstico e apresentou na peça cirúrgica o estadiamento patológico ypT3ypN2ypMx, com invasão vascular, linfática e perineural com 70% de células tumorais viáveis. Além disso, dos 25 linfonodos dissecados 6 estavam comprometidos. O paciente segue em tratamento adjuvante e apresentou margens positivas na cirurgia.

Por último, o paciente 5 tem estadiamento clínico IV, com metástase para o peritônio, ainda está em tratamento quimioterápico neoadjuvante, e não realizou cirurgia até o momento.

É desafiador imaginar o motivo da não-detecção do DNA tumoral mesmo com as altas coberturas aqui obtidas. Alguns motivos mais prováveis incluem i) um rigor exagerado de nossos filtros para exclusão de ruído de sequenciamento e ii) a massa relativamente limitada de DNA que pode ser usado como molde para a amplificação do gene alvo, que como discutido, limita nossas análises a uma busca em um universo de cerca de 3000 células. Deste modo, se os genomas tumorais estiverem em uma diluição próxima a este valor, possivelmente não conseguiremos detectá-lo e considerá-lo válido dentro dos critérios estabelecidos. No caso da falha de detecção após tratamento, é plausível especular que o tratamento neoadjuvante tenha sido capaz de diminuir, ou até mesmo exterminar os clones tumorais com *TP53* mutado e, que no caso de progressão da doença,

outros clones tenham proliferado. Em uma meta-análise realizada com 564 pacientes, foi visto que pacientes com a expressão de TP53 positiva (imunohistoquímica) respondem melhor ao tratamento neoadjuvante, porém isso não necessariamente se aplica para a presença de mutações neste gene (XU et al. 2014). Entretanto, este é um aspecto relevante que deve ser abordado em uma coorte ampla, para verificar se a presença de mutação no gene *TP53* teria valor prognóstico. Além disto, torna-se muito atraente uma análise cobrindo outros genes com alta frequência de mutação em ADGs, o que permitiria uma análise mais ampla.

Além do acompanhamento da frequência das mutações em *TP53* ao longo do tratamento, a **Figura 29** ilustra a variação da concentração de DNA total nos fluídos analisados entre as amostras mutadas e não-mutadas. Como é possível observar, houve diferença significativa ($p=0,017$) entre a concentração de DNA total nas amostras de LG pré-tratamento, com e sem mutação, a mesma diferença não foi vista para o plasma ($p=0,836$). Isso pode sugerir que a massa total de DNA é maior na presença de DNA tumoral. Corroborando este achado, a única amostra de LG pós-tratamento apresentou alta concentração de DNA total ($\sim 800\text{ng/ul}$) e uma frequência mutacional de 46,83%. Para uma análise mais informativa, em um segundo momento, avaliaremos novas amostras e também amostras de LG de controles sem câncer. No **Anexo 5** temos todos os dados de concentração e frequência mutacional para cada paciente.

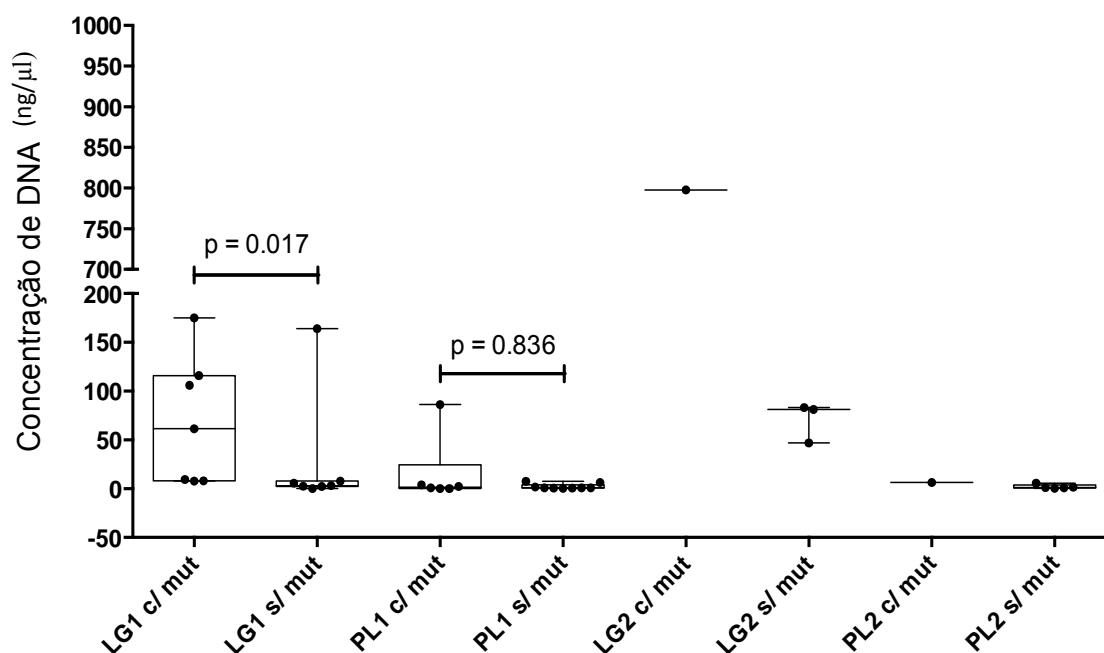


Figura 29 - Concentração de DNA total nas amostras de LG e PL. LG 1- LG pré tratamento; PL-1 Plasma pré – tratamento; LG 2- LG pós-tratamento; PL-2 Plasma pós-tratamento; mut- mutação.

Este dado corrobora aos achados de HAMAKAWA et al. (2014) que relataram ver uma associação entre o curso da doença e o aumento de ctDNA, mas não com a concentração de DNA total presente no plasma. Além disso, no seguimento dos pacientes após cirurgia, eles observaram que os níveis de ctDNA caem, indicando uma aplicação para a detecção de doença residual. Essa oscilação nos níveis de ctDNA também foi vista em pacientes com neoplasia maligna de cólon, que mostraram que níveis detectáveis de ctDNA se correlacionava com a extensão de ressecção cirúrgica. Indivíduos que tinham níveis crescentes de ctDNA após a cirurgia, em geral, recidivavam dentro de 1 ano (DIEHL et al. 2008). Portanto, tendo em vista os nossos resultados e os estudos feitos no cenário de biópsia

líquida, é plausível afirmar que tDNA pode servir como um biomarcador relevante para o acompanhamento dos pacientes, resposta quimioterápica e presença de doença residual mínima. Além disso, a identificação de mutações nos tumores pode servir como uma ferramenta útil para aplicações de diagnóstico e nos trazer mais informações sobre a heterogeneidade tumoral, sendo esta, uma informação mais limitada quando obtida das biópsias teciduais (FANG et al. 2016; SHODA et al. 2016).

5.8 PAINEL GÊNICO CUSTOMIZADO

Após avaliarmos um único gene para investigar o valor do uso do LG em um contexto de biópsia líquida, decidimos avaliar se seríamos capazes de identificar maior número de tumores mutados caso empregássemos um painel gênico mais amplo. Para isto, avaliamos algumas das amostras um painel gênico de captura customizado (Agilent, EUA – vide sessão 3.8). Este painel foi desenhado pelo nosso grupo e contém 113 genes identificados em alguns trabalhos como os mais frequentemente mutados em CG (BASS et al. 2014; CRISTESCU et al. 2015; KAKIUCHI et al. 2014; LIU et al. 2014; WONG et al. 2014), incluindo também *TP53*. Com isso, também foi possível fazer a validação de algumas mutações em *TP53* detectadas pelo painel *AmpliSeq*, além de verificar a presença de mutações em outros genes importantes em CG. No total, sequenciamos 16 amostras (7 biópsias, 8 lavados gástricos e um plasma), incluindo os pacientes 3, 12 e 15.

Em relação à validação das mutações de *TP53* pelo painel gênico de captura, geramos a **Tabela 10**, para também compararmos com as frequências mutacionais obtidas no sequenciamento anterior, onde usamos o AmpliSeq na plataforma Ion Proton. Todas as mutações detectadas pelo sequenciamento do painel *Ampliseq* de *TP53* foram validadas, com exceção da amostra de LG do paciente 15 (anteriormente indicada por 106 *reads*, ou 0,5%), apesar de uma cobertura vertical de 800X para a posição da variante. É importante ressaltar que para as amostras de LG fizemos novas extrações de DNA na tentativa de validar o achado inicial, de forma distinta das amostras de tumor e plasma, onde a mesma preparação de DNA foi sequenciada nos dois painéis.

Tabela 10 - Frequências das mutações encontradas no sequenciamento feito pelo sistema AmpliSeq e pelo painel customizado por captura.

	Paciente 3		Paciente 12		Paciente 15	
Ampli Seq TP53	Tumor	9,84%	Tumor	45,63%	Tumor	3,04%
	LG1	1,83%	LG1	4,41%	LG1	0,50%
	LG2	46,80%	LG2	73,71%		
Painel Agilent	Tumor	9,58%	Tumor	21,39%	LG1	0
	LG2	38,16%	LG1	0,32%		
			PI1	58,58%		

Legenda: LG1- Amostra de LG pré-tratamento; LG2- Amostra de LG pós-tratamento; PL1- Plasma pré- tratamento

Para calcularmos a correlação entre os dois painéis, plotamos os dados de frequência mutacional obtidos com as duas metodologias (**Figura 30**) e calculamos o índice de correlação de Pearson. Pudemos observar uma alta

e significativa correlação entre os resultados, o que sugere a confiabilidade das duas abordagens ($R^2 = 0,91$; $p=0,002$) e reforça a validade das frequências mutacionais observadas neste estudo.

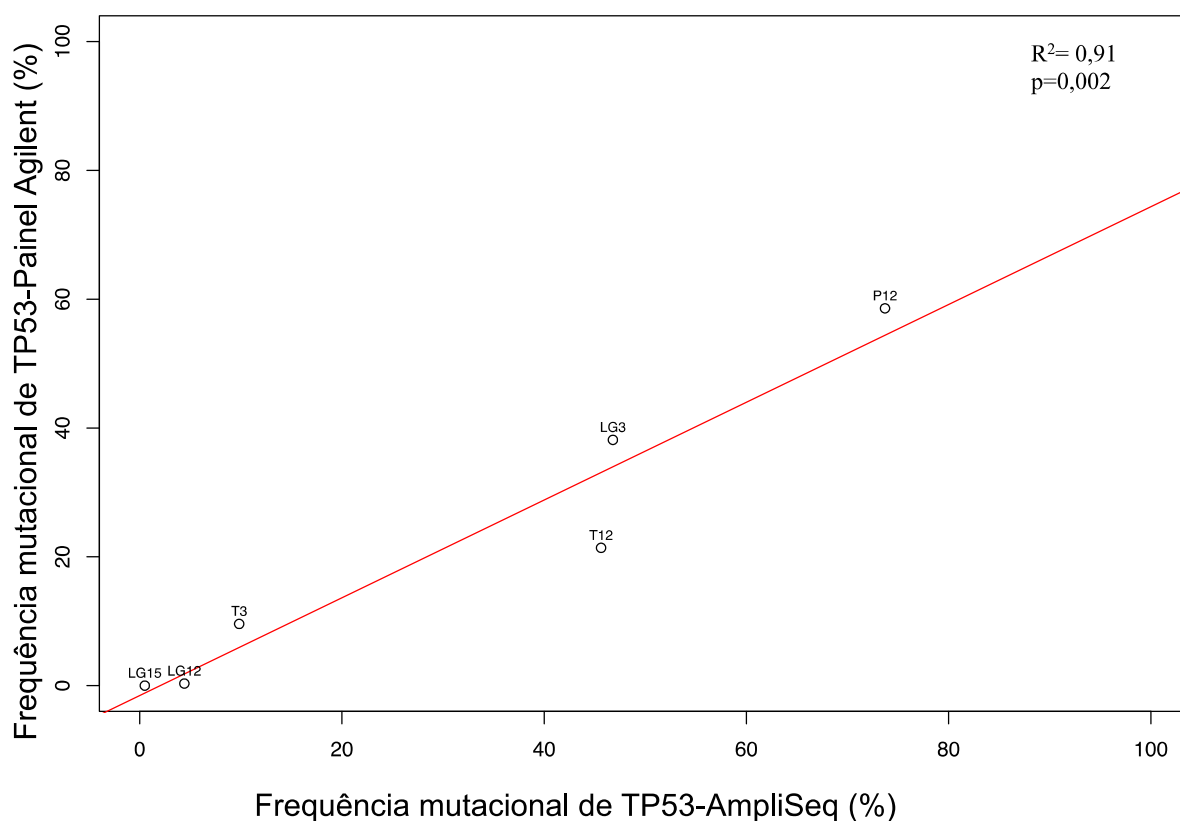


Figura 30 - Correlação entre as frequências das mutações em *TP53* nas duas plataformas de sequenciamento aplicada. T- Tumor; LG- LG; P- Plasma. Os números na frente das siglas identificam os pacientes. Paciente 3, 12 e 15.

Por fim, realizamos uma pequena análise piloto onde buscamos verificar a presença de outras mutações em biópsias tumorais de 5 pacientes, negativos para mutação em *TP53* avaliadas previamente pelo painel *Ampliseq*. O objetivo foi simplesmente testar se ao empregarmos um painel gênico mais abrangente poderíamos identificar pelo menos uma mutação em pelo menos um dos outros genes que compõem o painel, para

cada uma das amostras deste pequeno grupo negativo para mutações em *TP53*. O piloto se mostrou bem sucedido e fomos capazes de identificar pelo menos uma mutação em um dos genes do painel em todas as amostras (**Figura 31**). Este achado mostra ser viável um estudo mais amplo e informativo para um grande N amostral, agora não mais restrito a casos positivos para mutações em *TP53*.

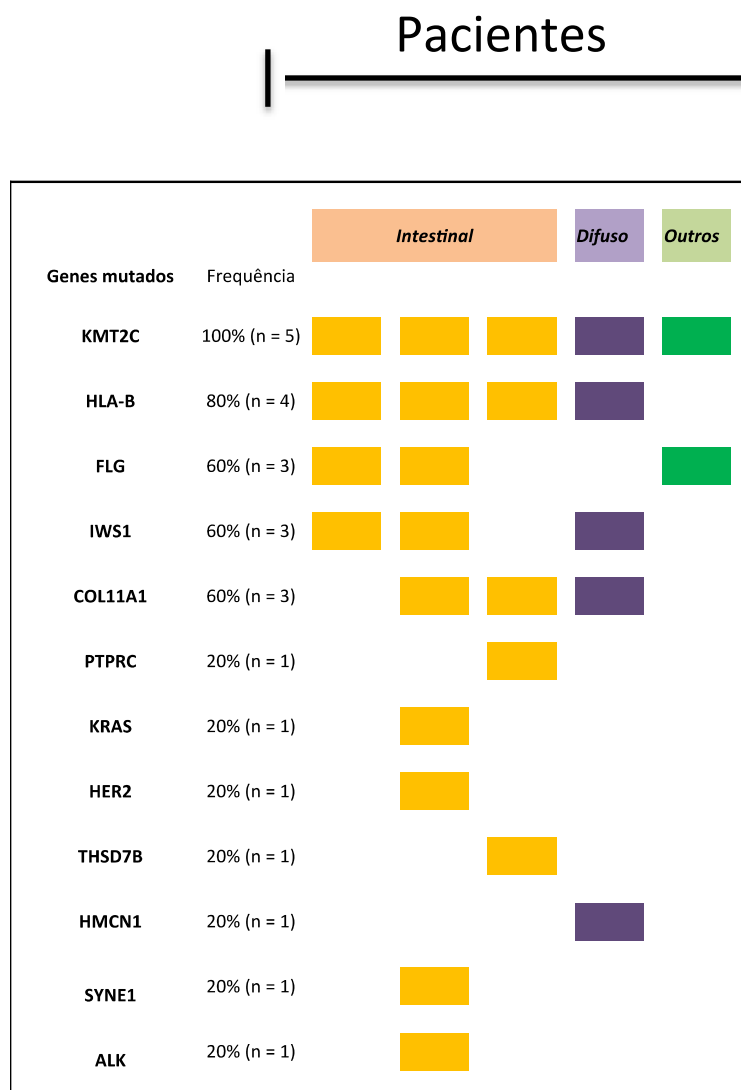


Figura 31 - Genes mais frequentemente mutados no painel de captura, por subtipo tumoral.

O gene *KMT2C* foi encontrado mutado em todas as cinco amostras de tumores sequenciadas no painel de captura. *KMT2C*, ou lisina metiltransferase 2C, codifica uma proteína que possui atividade principalmente relacionada a metilação de histonas. Mutações neste gene já haviam sido descritas em 3% dos CG, tanto em ADG difusos, como nos intestinais (KAKIUCHI et al. 2014). Além disso, ele também foi descrito por estar mutado em carcinomas de esôfago, sendo relatado que aproximadamente 30% destas neoplasias carregam alguma mutação nos genes remodeladores de cromatina, como o *KMT2C* (SASAKI et al. 2016).

O gene *HLA-B* (complexo principal de histocompatibilidade, classe I, B), faz parte de um complexo de proteínas e células do sistema imune que ajudam a distinguir proteínas próprias do corpo, de proteínas produzidas por células estranhas. Este gene foi encontrado mutado em média em 80% dos casos de nossa casuística. Nos dados do TCGA, este gene foi encontrado mutado nos tumores classificados como tumores hipermutados, juntamente com *TP53*, *KRAS*, *ARID1A*, *PIK3CA*, *ERBB3*, *PTEN* (BASS et al. 2014). Além disso, alguns dados mostram que os CG têm várias alterações nos genes *HLA* de classe I, como mutação, metilação e perda da heterozigose (HIRATA et al. 2007). Diante da natural hipervariabilidade do complexo HLA, este achado deve ser visto com cautela. Neste contexto de tumores hipermutados, vale ressaltar que para o segundo paciente da Figura 31, ele apresentou mutações em 9 dos 12 genes, sugerindo que ele poderia apresentar um tumor que se enquadrasse neste grupo.

KAKIUCHI et al. (2014) encontraram o gene *KRAS* mutado em 5% de sua casuística, já outros trabalhos relataram 6% e 9% (respectivamente: BASS et al. 2014; WANG et al. 2014). Este gene é encontrado frequentemente mutado no subtipo intestinal, estando mutado em 20% da nossa casuística que é de subtipo intestinal.

Em relação ao gene *ERBB2/HER2* 3% dos tumores CG-MSS (microsatélite estáveis) apresentavam mutações neste gene, conforme dados do TCGA (BASS et al. 2014), e 6% de uma população asiática (WANG et al. 2014). Além disso, esses dois trabalhos também relataram mutações em outros genes, que também foram confirmados por nossos dados, como *PTPRC*, mutado em 4%, e *THSD7B* mutado em 10% dos casos (respectivamente: BASS et al. 2014; WONG et al. 2014).

Também detectamos alterações em outros genes já descritos na literatura com mutações em CG. Dentre eles estão *ALK*, sendo descrito por alterações em ADG de células em anel de sinete (ZHAO et al. 2016) e *SYNE1* encontrado como um dos genes mais frequentemente mutados em tumores da junção gástricoesofágicas (CHONG et al. 2013). Esse último dado corrobora nosso achado, já que o único paciente que encontramos mutado para este gene tinha ADG proximal.

Os genes *FLG* e *HMCN1* foram encontrados mutados em ADG gástrico e colorretal (SKAABY et al. 2014; LEE et al. 2015). Por fim, a família do gene *COL11A1* é considerada promissora como biomarcadores prognósticos em CG (SUN 2016).

Além disso, em uma análise preliminar das amostras de LG e plasma também sequenciadas neste painel revelou que mutações nos genes mais frequentemente alterados, como *KMT2C*, *FLG* e *HLA-B*, também foram detectadas nos fluídos corporais. Mutações em baixa frequência, como a mutação na posição genômica 198677511 A>G do gene *PTPRC* encontrada em 4,5% na biópsia, também foi detectada no LG com uma frequência de 1,6%, confirmando sua utilidade em biópsia líquida. Do mesmo modo, detectamos no LG algumas mutações importantes no CG, não observadas nas biópsias. Exemplos incluem a mutação 49398514 C>A no gene *RHOA*, encontrada em duas amostras com frequência de 21,3% e 15,3% .e no gene *PIK3CA* com frequência de 13% na posição genômica 178936082 C>T, não sendo detectada na biópsia tumoral. Também encontramos mutações igualmente interessantes no plasma mas os dados ainda precisam ser cuidadosamente analisados.

Dessa forma, podemos concluir que a utilização de um painel gênico amplo customizado para o CG, aliado ao estudo concomitante de plasma e de LG, pode se consolidar como uma ferramenta promissora na detecção de mutações tumorais e na sua avaliação para monitoramento da doença. Em uma próxima etapa deste trabalho buscaremos a detecção das mesmas alterações encontradas nos tumores, também nas amostras de biópsias líquidas de plasma e LG, em um maior N amostral.

6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados gerados neste trabalho podemos concluir:

- 32,6% das biópsias tumorais de ADG mostraram mutações em *TP53*, sendo que destas 33,3% (8/24) eram do subtipo difuso e 40% (6/15) do subtipo intestinal.
- LG e plasma revelaram taxas similares de detecção de mutação, respectivamente 53,9% (7/13) e 40% (6/15).
- Uma análise combinada de LG e plasma permitiu identificar mutações tumorais em 60% (9/15) dos casos.
- O sequenciamento de *TP53* em LG de pacientes com ADG revelou 4 mutações não identificadas nas respectivas biópsias tumorais.
- O acompanhamento da resposta terapêutica e da evolução da doença tem o potencial de se beneficiar da detecção de ctDNA.
- O uso de um painel gênico customizado se mostrou promissor na identificação de genes úteis no seguimento dos pacientes em um contexto de biópsia líquida com potencial de beneficiar a maioria dos casos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abedi-Ardekani B, Hainaut P. Cancers of the upper gastro-intestinal tract: a review of somatic mutation distributions. **Arch Iran Med** 2014; 17:286-92.

Adachi Y, Shiraishi N, Suematsu T, Shiromizu A, Yamaguchi K, Kitano S. Most important lymph node information in gastric cancer: multivariate prognostic study. **Ann Surg Oncol** 2000; 7:503-507.

Akiba S, Koriyama C, Herrera-Goepfert R, Eizuru Y. Epstein-Barr virus associated gastric carcinoma: Epidemiological and clinicopathological features. **Cancer Sci** 2008; 99:195-201.

Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Siu HC, Leung SY, Stratton MR. A mutational signature in gastric cancer suggests therapeutic strategies. **Nat Commun** 2015; 6:8683.

Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, et al. Signatures of mutational processes in human cancer. **Nature** 2013a; 500:415-21.

Ali SM, Sanford EM, Klempner SJ, et al. Prospective Comprehensive Genomic Profiling of Advanced Gastric Carcinoma Cases Reveals Frequent Clinically Relevant Genomic Alterations and New Routes for Targeted Therapies. **Oncologist** 2015; 20:499-507.

Alsina M, Moehler M, Hierro C, Guardado R, Tabernero J. Immunotherapy for Gastric Cancer: A Focus on Immune Checkpoints. **Target Oncol** 2016; 11:469-77.

An JY, Kim H, Cheong JH, Hyung WJ, Kim H, Noh SH. Microsatellite instability in sporadic gastric cancer: Its prognostic role and guidance for 5-FU based chemotherapy after R0 resection. **Int J Cancer** 2012; 131:505-11.

Ananiev J, Tchernev G, Patterson JW, Gulubova M, Ganchev G. p53 - The Guardian of Genome. **Acta Medica Bulg** 2011; .

Andersen RF, Spindler K-LG, Brandslund I, Jakobsen A, Pallisgaard N. Improved sensitivity of circulating tumor DNA measurement using short PCR amplicons. **Clin Chim Acta** 2015; 439:97-101.

Asahi M, Azuma T, Ito S, et al. Helicobacter pylori CagA Protein Can Be Tyrosine Phosphorylated in Gastric Epithelial Cells. **J Exp Med** 2000; 025931000:593-602.

Assumpcao PP, Ishak G, Chen ES, et al. Numerical aberrations of chromosome 8 detected by conventional cytogenetics and fluorescence in situ hybridization in individuals from northern Brazil with gastric adenocarcinoma. **Cancer Genet Cytogenet** 2006; 169:45-9.

Aubrey BJ, Strasser A, Kelly GL. Tumor-suppressor functions of the tp53 pathway. **Cold Spring Harb Perspect Med** 2016; 6:pil: a026062.

Bailey P, Chang DK, Nones K, et al. Genomic analyses identify molecular subtypes of pancreatic cancer. **Nature** 2016; 531:47-52.

Bamboato ZM, Tang LH, Vinuela E, et al. Stage-stratified prognosis of signet ring cell histology in patients undergoing curative resection for gastric adenocarcinoma. **Ann Surg Oncol** 2014; 21:1678-85.

Baniak N, Senger J-L, Ahmed S, Kanthan SC, Kanthan R. Gastric biomarkers: a global review. **World J Surg Oncol** 2016; 14:212.

Bass AJ, Thorsson V, Shmulevich I, et al. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. **Nature** 2014; 513:202-9.

Beeharry MK, Liu WT, Yan M, Zhu ZG. New blood markers detection technology: A leap in the diagnosis of gastric cancer. **World J Gastroenterol** 2016; 22:1202-12.

Begnami MD, Fregnani JHTG, Brentani H, et al. Identification of protein expression signatures in gastric carcinomas using clustering analysis. **J Gastroenterol Hepatol** 2012; 27:378-84.

Bellini MF, Cadamuro ACT, Succi M, Proença MA, Silva AE. Alterations of the TP53 gene in gastric and esophageal carcinogenesis. **J Biomed Biotechnol** 2012; 2012:891961.

Belyi VA, Ak P, Markert E, et al. The origins and evolution of the p53 family of genes. **Cold Spring Harb Perspect Biol** 2010; 2:a001198.

Bettegowda C, Sausen M. Detection of Circulating Tumor DNA in Early- and Late-Stage Human Malignancies. **Sci Transl** 2014; 6: 224ra24.

Bockorny B, Pectasides E. The emerging role of immunotherapy in gastric and esophageal adenocarcinoma. **Future Oncol** 2016; 12:1833-46.

Borch K, Jönsson B, Tarpila E, et al. Changing pattern of histological type, location, stage and outcome of surgical treatment of gastric carcinoma. **Br J Surg** 2000; 87:618-26.

Bronner IF, Quail MA, Turner DJ, Swerdlow H. Improved protocols for Illumina sequencing. **Curr Protoc Hum Genet** 2014; 80:18.2.1-42.

Brueckl WM, Heinze E, Milsmann C, et al. Prognostic significance of microsatellite instability in curatively resected adenocarcinoma of the small intestine. **Cancer Lett** 2004; 203:181-90.

Brusa G, Benvenuti M, Mazzacurati L, et al. p53 loss of function enhances genomic instability and accelerates clonal evolution of murine myeloid progenitors expressing the p210BCR-ABL tyrosine kinase. **Haematologica** 2003; 88:622-630.

Busuttil R A, Zapparoli G V, Haupt S, et al. Role of p53 in the progression of gastric cancer. **Oncotarget** 2014; 5:12016-26.

Busuttil RA, Zapparoli G V, Haupt S, et al. Role of p53 in the progression of gastric cancer. **Oncotarget** 2014; 5:12016-26.

Căinap C, Nagy V, Gherman A, et al. Classic Tumor Markers in Gastric Cancer. Current Standards and Limitations. **Clujul Med** 2015; 88:111-5.

Carl-mcgrath S, Ebert M, Röcken C. Gastric adenocarcinoma : epidemiology , pathology and pathogenesis Review Article. **Cancer Ther** 2007; 5:877-94.

Casadio V, Calistri D, Tebaldi M, et al. Urine cell-free DNA integrity as a marker for early bladder cancer diagnosis: preliminary data. **Urol Oncol** 2013; 31:1744-50.

Cascalho M. Advantages and disadvantages of cytidine deamination. **J Immunol** 2004; 172:6513-8.

Chan KCA, Jiang P, Zheng YWL, et al. Cancer genome scanning in plasma: Detection of tumor-associated copy number aberrations, single-nucleotide variants, and tumoral heterogeneity by massively parallel sequencing. **Clin Chem** 2013; 59:211-224.

Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: The cancer-immunity cycle. **Immunity** 2013; 39:1-10.

Chen K, Yang D, Li X, et al. Mutational landscape of gastric adenocarcinoma in Chinese: implications for prognosis and therapy. **Proc Natl Acad Sci U.S.A.** 2015a; 112:1107-12.

Chen X-Z, Chen H, Castro F A., Hu J-K, Brenner H. Epstein-Barr virus infection and gastric cancer: a systematic review. **Medicine (Baltimore)** 2015b; 94:e792.

Choi YY, Bae JM, An JY, et al. Is microsatellite instability a prognostic marker in gastric cancer?: A systematic review with meta-analysis. **J Surg Oncol** 2014; 110:129-135.

Choi YY, Noh SH, Cheong J-H. Molecular dimensions of gastric cancer: translational and clinical perspectives. **J Pathol Transl Med** 2016; 50:1-9.

Chong IY, Cunningham D, Barber LJ, et al. The genomic landscape of oesophagogastric junctional adenocarcinoma. **J Pathol** 2013; 231:301-10.

Ciriello G, Miller ML, Aksoy BA, Senbabaoglu Y, Schultz N, Sander C. Emerging landscape of oncogenic signatures across human cancers. **Nat Genet.** 2013; 45:1127-33.

Coccolini F, Montori G, Ceresoli M, et al. Advanced gastric cancer : what we know and what we still have to learn. **World J Gastroenterol** 2016; 22:1139-59.

Correa P. Human gastric carcinogenesis: A multistep and multifactorial process - First American cancer society award lecture on cancer epidemiology and prevention. **Cancer Res** 1992; 52:6735-40.

Correa P, Chen VW. Gastric cancer. **Cancer Surv** 1994; 19-20:55-76.

Corso G, Carvalho J, Marrelli D, et al. Somatic mutations and deletions of the e-cadherin gene predict poor survival of patients with gastric cancer. **J Clin Oncol** 2013; 31:868-75.

Costa Jr WL, Coimbra FJ, Ribeiro HS, et al. Safety and preliminary results of perioperative chemotherapy and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC) for high-risk gastric cancer patients WORLD JOURNAL OF SURGICAL ONCOLOGY. **World J Surg Oncol** 2012; 10:195.

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.

Cui L, Zhang X, Ye G, et al. Gastric juice MicroRNAs as potential biomarkers for the screening of gastric cancer. **Cancer** 2013a; 119:1618-26.

Cui M, Fan M, Jing R, et al. Cell-free circulating DNA: A new biomarker for the acute coronary syndrome. **Cardiology** 2013b; 124:76-84.

Cunningham SC, Kamangar F, Kim MP, et al. Survival after gastric adenocarcinoma resection: Eighteen-year experience at a single institution. **J Gastrointest Surg** 2005; 9:718-25.

Dawson S-J, Tsui DWY, Murtaza M, et al. Analysis of Circulating Tumor DNA to Monitor Metastatic Breast Cancer. **N Engl J Med** 2013; 368:1199-209.

De Mattos-Arruda L, Olmos D, Tabernero J. Prognostic and predictive roles for circulating biomarkers in gastrointestinal cancer. **Futur Oncol** 2011; 7:1385-97.

De Mattos-Arruda L, Mayor R, Ng CKY, et al. Cerebrospinal fluid-derived circulating tumour DNA better represents the genomic alterations of brain tumours than plasma. **Nat Commun** 2015; 6:8839.

Den Hoed CM, Kuipers EJ. Gastric Cancer: How Can We Reduce the Incidence of this Disease? **Curr Gastroenterol Rep** 2016; 18:34.

Deng N, Goh LK, Wang H, et al. A comprehensive survey of genomic alterations in gastric cancer reveals systematic patterns of molecular exclusivity and co-occurrence among distinct therapeutic targets. **Gut** 2012; 61:673-84.

Diaz L A., Bardelli A. Liquid biopsies: Genotyping circulating tumor DNA. **J Clin Oncol** 2014; 32:579-86.

Dicken BJ, Bigam DL, Cass C, Mackey JR, Joy A A, Hamilton SM. Gastric adenocarcinoma: review and considerations for future directions. **Ann Surg** 2005; 241:27-39.

Diehl F, Li M, Dressman D, et al. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. **Proc Natl Acad Sci U.S.A.** 2005; 102:16368-73.

Diehl F, Schmidt K, Choti M A, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. **Nat Med** 2008; 14:985-90.

Dikken JL, Van de Velde CJH, Coit DG, Shah M A, Verheij M, Cats A. Treatment of resectable gastric cancer. **Terap Adv Gastroenterol** 2012; 5:49-69.

Esposito A, Bardelli A, Criscitiello C, et al. Monitoring tumor-derived cell-free DNA in patients with solid tumors: Clinical perspectives and research opportunities. **Cancer Treat Rev** 2014; 40:648-55.

Fang WL, Lan YT, Huang KH, et al. Clinical significance of circulating plasma DNA in gastric cancer. **Int J Cancer** 2016; 138:2974-83.

Fuccio L, Eusebi LH, Bazzoli F. Gastric cancer, Helicobacter pylori infection and other risk factors. **World J Gastrointest Oncol** 2010; 2:342-7.

Giardiello FM, Welsh SB, Hamilton SR, et al. Increased risk of cancer in the Peutz-Jeghers syndrome. **N Engl J Med** 1987; 316:1511-4.

Goldstein DB, Hirschhorn JN. In genetic control of disease, does 'race' matter? **Nat Genet** 2004; 36:1243-4

Gore RM. Gastric cancer. Clinical and pathologic features **Radiol Clin North Am** 1997; 35:295-310.

Goseki N, Takizawa T, Koike M. Differences in the mode of the extension of gastric cancer classified by histological type: new histological classification of gastric carcinoma. **Gut** 1992; 33:606-12.

Gotoda T, Iwasaki M, Kusano C, Seewald S, Oda I. Endoscopic resection of early gastric cancer treated by guideline and expanded National Cancer Centre criteria. **Br J Surg** 2010; 97:868-71.

Grabsch HI, Tan P. Gastric cancer pathology and underlying molecular mechanisms. **Dig Surg** 2013; 30:150-8.

Gravalos C, Jimeno A. HER2 in gastric cancer: A new prognostic factor and a novel therapeutic target. **Ann Oncol** 2008; 19:1523-9.

Greenman C, Stephens P, Smith R, et al. Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. **Nature** 2007; 446:153-8.

György B, Pálóczi K, Kovács A, et al. Improved circulating microparticle analysis in acid-citrate dextrose (ACD) anticoagulant tube. **Thromb Res** 2014; 133:285-92.

Håkanson R, Lilja B, Owman C, Thunell S. Changes in gastric secretion induced by certain amines, amine precursors and related enzyme inhibitors. **Eur J Pharmacol** 1967; 1:425-33.

Hamakawa T, Kukita Y, Kurokawa Y, et al. Monitoring gastric cancer progression with circulating tumour DNA. **Br J Cancer** 2014; 112:352-6.

Hamelin R, Flejou JF, Muzeau F, et al. TP53 gene mutations and p53 protein immunoreactivity in malignant and premalignant Barrett's esophagus. **Gastroenterology** 1994; 107:1012-8.

Fenoglio-Preiser C, Carneiro F, Correa P, et al. Gastric carcinoma. In: Hamilton SR, Aaltonen LA, editors. **Pathology & genetics tumours of the digestive system**. Lyon: IARC Press, 2000. p.39-52. (IARC WHO Classification of Tumours, n° 2).

Hanazono K, Natsugoe S, Stein HJ, Aikou T, Hoefler H, Siewert JR. Distribution of p53 mutations in esophageal and gastric carcinomas and the relationship with p53 expression. **Oncol Rep** 2006; 15:821-4.

Haradhvala NJ, Polak P, Stojanov P, et al. Mutational Strand Asymmetries in Cancer Genomes Reveal Mechanisms of DNA Damage and Repair. **Cell** 2016; 164:538-49.

Henderson S, Chakravarthy A, Su X, Boshoff C, Fenton TR. APOBEC-Mediated Cytosine Deamination Links PIK3CA Helical Domain Mutations to Human Papillomavirus-Driven Tumor Development. **Cell Rep** 2014; 7:1833-41.

Henson DE, Dittus C, Younes M, Nguyen H, Albores-Saavedra J Differential trends in the intestinal 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.

Higashi H, Tsutsumi R, Muto S, et al. SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of Helicobacter pylori CagA protein. **Science** 2002; 295:683-6.

Hirata T, Yamamoto H, Taniguchi H, et al. Characterization of the immune escape phenotype of human gastric cancers with and without high-frequency microsatellite instability. **J Pathol** 2007; 211:516-23.

Howe HL, Wu X, Ries LAG, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2003, featuring cancer among U.S. Hispanic/Latino populations. **Cancer**, 2006; 107:1711-42.

Hu N, Kadota M, Liu H, et al. Genomic landscape of somatic alterations in esophageal squamous cell carcinoma and gastric cancer. **Cancer Res** 2016; 76:1714-23.

Huang L, Xu A, Li T, Han W, Wu S, Wang Y. Detection of perioperative cancer antigen 72-4 in gastric juice pre- and post-distal gastrectomy and its significances. **Med Oncol** 2013; 30:651.

Huang XE, Tajima K, Hamajima N, et al. Effects of dietary, drinking, and smoking habits on the prognosis of gastric cancer. **Nutr Cancer** 2000; 38:30-6.

Huntsman DG, Carneiro F, Lewis FR, et al. Early gastric cancer in young, asymptomatic carriers of germ-line E-cadherin mutations. **N Engl J Med** 2001; 344:1904-9.

Ireland AP, Shibata DK, Chandrasoma P, Lord R V, Peters JH, DeMeester TR. Clinical significance of p53 mutations in adenocarcinoma of the esophagus and cardia. **Ann Surg** 2000; 231:179-87.

Italiano A. Prognostic or predictive? It's time to get back to definitions! **J Clin Oncol** 2011; 29:4718; author reply 4718-9.

Jácome AADA, Lima EM DE, Kazzi AI, et al. Epstein-Barr virus-positive gastric cancer: a distinct molecular subtype of the disease? **Rev Soc Bras Med Trop** 2016; 49:150-7.

Jahr S, Hentze H, Englisch S, et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. **Cancer Res** 2001; 61:1659-65.

Jcome A A., Coutinho AK, Lima EM, Andrade AC, Dos Santos JS. Personalized medicine in gastric cancer: Where are we and where are we going? **World J Gastroenterol** 2016; 22:1160-71.

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.

Kanda M, Kodera Y. 2015 Advances in Gastric Cancer Recent advances in the molecular diagnostics of gastric cancer. **World J Gastroenterol** 2015; 21:9838-52.

Kaneda A, Matsusaka K, Aburatani H, Fukayama M. Epstein-Barr virus infection as an epigenetic driver of tumorigenesis. **Cancer Res** 2012; 72:3445-50.

Kano Y, Kosugi SI, Ishikawa T, et al. Prognostic significance of peritoneal lavage cytology at three cavities in patients with gastric cancer. **Surg (United States)** 2015; 158:1581-9.

Karpeh MS, Brennan MF. Gastric carcinoma. **Ann Surg Oncol** 1998; 5:650-6.

Keates S, Keates A C, Warny M, Peek RM, Murray PG, Kelly CP. Differential activation of mitogen-activated protein kinases in AGS gastric epithelial cells by cag+ and cag- Helicobacter pylori. **J Immunol.** 1999; 163:5552-5559.

Kim J, Sun C-L, Mailey B, et al. Race and ethnicity correlate with survival in patients with gastric adenocarcinoma. **Ann Oncol** 2010; 21:152-160.

Kim K, Shin DG, Park MK, et al. Circulating cell-free DNA as a promising biomarker in patients with gastric cancer: diagnostic validity and significant reduction of cfDNA after surgical resection. **Ann Surg Treat. Res** 2014; 86:136-42.

Kim K, Shin DG, Park MK, et al. Circulating cell-free DNA as a promising biomarker in patients with gastric cancer: diagnostic validity and significant reduction of cfDNA after surgical resection. **Ann Surg Treat. Res** 2014; 86:136-42.

Kim SY, Choi YY, An JY, et al. The benefit of microsatellite instability is attenuated by chemotherapy in stage II and stage III gastric cancer: Results from a large cohort with subgroup analyses. **Int J Cancer** 2015; 137:819-825.

- Kim YS. Quantitative analysis of cell-free DNA in the plasma of gastric cancer patients. **Oncol Lett** 2012; 921-926.
- Kohno Y, Yamamoto H, Hirahashi M, et al. Reduced MUTYH, MTH1, and OGG1 expression and TP53 mutation in diffuse-type adenocarcinoma of gastric cardia. **Hum. Pathol** 2016a; 52:145-152.
- Kohno Y, Yamamoto H, Hirahashi M, et al. Reduced MUTYH, MTH1, and OGG1 expression and TP53 mutation in diffuse-type adenocarcinoma of gastric cardia. **Hum. Pathol** 2016b; 52:145-152.
- Koito A, Ikeda T. Intrinsic immunity against retrotransposons by APOBEC cytidine deaminases. **Front. Microbiol.**, 2013; .
- Konturek PC, Konturek SJ, Brzozowski T. Gastric cancer and Helicobacter pylori infection. **J Physiol Pharmacol** 2006; 57 Suppl 3:51-65.
- Kuck D, Kolmerer B, Iking-Konert C, Krammer PH, Stremmel W, Rudi J. Vacuolating cytotoxin of Helicobacter pylori induces apoptosis in the human gastric epithelial cell line AGS. **Infect. Immun.** 2001; 69:5080-5087.
- Kuo CH, Liu CJ, Yang CC, et al. A Rapid and Accurate Method to Evaluate Helicobacter pylori Infection, Clarithromycin Resistance, and CYP2C19 Genotypes Simultaneously From Gastric Juice. **Med** 2016; 95:e3458.
- 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.
- Lee J, Van Hummelen P, Go C, et al. High-throughput mutation profiling identifies frequent somatic mutations in advanced gastric adenocarcinoma. **PLoS One** 2012; 7: e38892.
- Lee SH, Je EM, Yoo NJ, Lee SH. HMCN1, a cell polarity-related gene, is somatically mutated in gastric and colorectal cancers. **Pathol Oncol Res** 2015; 21:847-8.
- Lee Y-S, Cho YS, Lee GK, et al. Genomic profile analysis of diffuse-type gastric cancers. **Genome Biol** 2014; 15:R55.

Lei Z, Tan IB, Das K, et al. Identification of molecular subtypes of gastric cancer with different responses to PI3-kinase inhibitors and 5-fluorouracil. **Gastroenterology** 2013; 145:554-65.

Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. **Cancer Res** 1977; 37:646-50.

Li X, Wu WKK, Xing R, et al. Distinct subtypes of gastric cancer defined by molecular characterization include novel mutational signatures with prognostic capability. **Cancer Res** 2016; 76:1724-32.

Liang H, Kim YH. Identifying molecular drivers of gastric cancer through next-generation sequencing. **Cancer Lett** 2013; 340:241-6.

Lim B, Kim JH, Kim M, Kim SY. Genomic and epigenomic heterogeneity in molecular subtypes of gastric cancer. **World J Gastroenterol** 2016; 22:1190-201.

Lim BH, Soong R, Grieu F, Robbins PD, House AK, Iacopetta BJ p53 accumulation and mutation are prognostic indicators of poor survival in human gastric carcinoma. **Int J Cancer** 1996; 69:200-4.

Lin Y, Wu Z, Guo W, Li J Gene mutations in gastric cancer: a review of recent next-generation sequencing studies. **Tumor Biol** 2015b; 36:7385-94.

Liu J, McClelland M, Stawiski EW, et al. Integrated exome and transcriptome sequencing reveals ZAK isoform usage in gastric cancer. **Nat Commun** 2014; 5:3830.

Lui YYN, Dennis YML. Circulating DNA in plasma and serum: biology, preanalytical issues and diagnostic applications. **Clin Chem Lab Med** 2002; 40:962-8.

Lynch HT, Smyrk T. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome): An updated review. **Cancer**, 1996; 78:1149-67.

Magalhães Queiroz DM, Luzza F. Epidemiology of Helicobacter pylori infection. **Helicobacter**. 2006; 11 Suppl 1:1-5.

Martin-Richard M, Custodio A, García-Girón C, et al. Seom guidelines for the treatment of gastric cancer 2015. 2015; 17:996-1004.

Matsumoto Y, Marusawa H, Kinoshita K, et al. Helicobacter pylori infection triggers aberrant expression of activation-induced cytidine deaminase in gastric epithelium. **Nat Med** 2007; 13:470-6.

Mauger F, Dulary C, Daviaud C, Deleuze J, Tost J. Comprehensive evaluation of methods to isolate, quantify, and characterize circulating cell-free DNA from small volumes of plasma. **Anal Bioanal Chem** 2015; 407:6873-8.

Mead R, Duku M, Bhandari P, Cree IA. Circulating tumour markers can define patients with normal colons, benign polyps, and cancers. **Br J Cancer** 2011; 105:239-45.

Meireles SI, Cristo EB, Carvalho AF, et al. Molecular Classifiers for Gastric Cancer and Nonmalignant Diseases of the Gastric Mucosa Molecular Classifiers for Gastric Cancer and Nonmalignant Diseases of the Gastric Mucosa. 2004; 1255-65.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer José de Alencar Gomes da Silva. **Tipos de câncer: estômago**. Disponível em: <URL:<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/ovario>>. [2016 abr. 02]

Ming SC. Gastric carcinoma: a pathobiological classification. **Cancer** 1977; 39:2475-85.

Moritani S, Kushima R, Sugihara H, Hattori T. Phenotypic characteristics of Epstein-Barr-virus-associated gastric carcinomas. **J Cancer Res Clin Oncol** 1996; 122:750-6.

Msika S, Benhamiche A M, Jouve JL, Rat P, Faivre J Prognostic factors after curative resection for gastric cancer. A population-based study. **Eur J Cancer** 2000; 36:390-6.

Mulligan RM. Histogenesis and biologic behavior of gastric carcinoma. **Pathol Annu** 1972; 7:349-415.

Muretto P, Ruzzo A., Pizzagalli F, et al. Endogastric capsule for E-cadherin gene (CDH1) promoter hypermethylation assessment in DNA from gastric juice of diffuse gastric cancer patients. **Ann Oncol** 2008; 19:516-9.

Murphy G, Pfeiffer R, Camargo MC, Rabkin CS. Meta-analysis Shows That Prevalence of Epstein-Barr Virus-Positive Gastric Cancer Differs Based on Sex and Anatomic Location. **Gastroenterology** 2009; 137:824-33.

Nagini S. Carcinoma of the stomach: A review of epidemiology, pathogenesis, molecular genetics and chemoprevention. **World J Gastrointest Oncol** 2012; 4:156-69.

Nakamura K, Sugano H, Takagi K. Carcinoma of the stomach in incipient phase: its histogenesis and histological appearances. **Gann** 1968; 59:251-8.

Nannini M, Astolfi A, Urbini M, Biasco G, Pantaleo M A. Liquid biopsy in gastrointestinal stromal tumors: a novel approach. **J Transl Med** 2014; 12:210.

Nguyen T, Brunson D, Crespi CL, Penman BW, Wishnok JS, Tannenbaum SR. DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro. **Proc Natl Acad Sci U.S.A.** 1992; 89:3030-4.

Nik-Zainal S, Alexandrov LB, Wedge DC, et al. Mutational processes molding the genomes of 21 breast cancers. **Cell** 2012; 149:979-93.

Nishida Y, Kuwata T, Nitta H, et al. A novel gene-protein assay for evaluating HER2 status in gastric cancer: simultaneous analyses of HER2 protein overexpression and gene amplification reveal intratumoral heterogeneity. **Gastric Cancer** 2015; 18:458-66.

Niv Y, Fraser G, Delpre G, et al. Helicobacter pylori infection and blood groups. **Am J Gastroenterol** 1996; 91:101-4.

Nunes DN, Kowalski LP, Simpson AJ Detection of oral and oropharyngeal cancer by microsatellite analysis in mouth washes and lesion brushings. **Oral Oncol** 2000; 36:525-8.

Odenbreit S, Püls J, Sedlmaier B, Gerland E, Fischer W, Haas R. Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. **Science** 2000; 287:1497-500.

Offerhaus GJ, Giardiello FM, Krush AJ, et al. The risk of upper gastrointestinal cancer in familial adenomatous polyposis. **Gastroenterology** 1992; 102:1980-2.

Oki E, Zhao Y, Yoshida R, et al. The difference in p53 mutations between cancers of the upper and lower gastrointestinal tract. **Digestion** 2009; 79 Suppl 1:33-9.

Oldenhuis CNAM, Oosting SF, Gietema JA, De Vries EGE. Prognostic versus predictive value of biomarkers in oncology. **Eur J Cancer** 2008; 44:946-53.

Oyama K, Fushida S, Tsukada T, et al. Evaluation of serum HER2-ECD levels in patients with gastric cancer. **J Gastroenterol** 2015; 50:41-5.

Pan W, Gu W, Nagpal S, Gephart MH, Quake SR. Brain tumor mutations detected in cerebral spinal fluid. **Clin Chem** 2015; 61:514-22.

Park KU, Lee HE, Park DJ, et al. MYC quantitation in cell-free plasma DNA by real-time PCR for gastric cancer diagnosis. **Clin Chem Lab Med** 2009; 47:530-6.

Parkin DM. Global cancer statistics in the year 2000. **Lancet Oncol** 2001; 2:533-43.

Patel KM, Tsui DWY. The translational potential of circulating tumour DNA in oncology. **Clin BioChem** 2015; 48:957-61.

Peart MJ, Prives C. Mutant p53 gain of function: The NF-Y connection. **Cancer Cell** 2006; 10:173-4.

Peddanna N, Holt S, Verma RS. Genetics of gastric cancer. **Anticancer Res** 1995; 15:2055-64.

Pernot S, Voron T, Perkins G, Lagorce-Pages C, Berger A, Taieb J. Signet-ring cell carcinoma of the stomach: Impact on prognosis and specific therapeutic challenge. **World J Gastroenterol** 2015; 21:11428-38.

Petitjean A, Achatz MI, Borresen-Dale AL, Hainaut P, Olivier M. TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. **Oncogene** 2007; 26:2157-65.

Philipp AB, Nagel D, Stieber P, et al. Circulating cell-free methylated DNA and lactate dehydrogenase release in colorectal cancer. **BMC Cancer** 2014; 14:245.

Pinto-de-Sousa J, David L, Seixas M, Pimenta A. Clinicopathologic profiles and prognosis of gastric carcinomas from the cardia, fundus/body and antrum. **Dig Surg** 2001; 18:102-10.

Pizzi MP, Freitas HC, Amorim MG, et al. TP53 mutations in gastric adenocarcinomas of an ethnically admixed population. [abstract] **Cancer Res** 2016; 76(14 suppl):A3697. [Presented at AACR 107th Annual Meeting 2016; April 16-20, 2016; New Orleans, LA.

Polk D Brent PRM. Helicobacter pylori: gastric cancer and beyond. **Nat Rev Cancer** 2010; 10:403-14.

Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ, et al. Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. **N Engl J Med** 2003; 349:247-57.

Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, et al. Cell migration: integrating signals from front to back. **Science** 2003; 302:1704-9.

Rodríguez Burbano R, Pimentel Assumpção P, Ferreira Leal M, et al. C-MYC locus amplification as metastasis predictor in intestinal-type gastric adenocarcinomas: CGH study in Brazil. **Anticancer Res** 2006; 26:2909-14.

Roukos DH, Kappas AM Perspectives in the treatment of gastric cancer. **Nat Clin Pract Oncol** 2005; 2:98-107.

Ryan JL, Shen YJ, Morgan DR, et al. Epstein-barr virus infection is common in inflamed gastrointestinal mucosa. **Dig Dis Sci** 2012; 57:1887-98.

Sadeghi RN, Damavand B, Vahedi Mohsen M, et al. Detection of p53 common intron polymorphisms in patients with gastritis lesions from Iran **Asian Pacific J Cancer Prev** 2013; 14:91-6.

Sadowski DC, Rabeneck L. Gastric ulcers at endoscopy: brush, biopsy, or both? **Am J Gastroenterol** 1997; 92:608-13.

Safatle-Ribeiro A V., Ribeiro U, Reynolds JC, et al. Morphologic, histologic, and molecular similarities between adenocarcinomas arising in the gastric stump and the intact stomach. **Cancer** 1996; 78:2288-99.

Saikawa Y, Fukuda K, Takahashi T, Nakamura R, Takeuchi H, Kitagawa Y. Gastric carcinogenesis and the cancer stem cell hypothesis. **Gastric Cancer** 2010; 13:11-24.

Saito T, Sugimura T. Interaction of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine with DNA and histone in rat tissues in vivo. **Gan** 1973; 64:537-43.

Sargent DJ, Marsoni S, Monges G, et al. Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer. **J Clin Oncol** 2010; 28:3219-26.

Sasaki Y, Tamura M, Koyama R, Nakagaki T, Adachi Y, Tokino T. Genomic characterization of esophageal squamous cell carcinoma: Insights from next-generation sequencing. **World J Gastroenterol** 2016; 22:2284-93.

Schwartz JL, Jordan R, Liber H, Murnane JP, Evans HH. TP53-dependent chromosome instability is associated with transient reductions in telomere length in immortal telomerase-positive cell lines. **Genes Chromosom Cancer** 2001; 30:236-44.

Schwarzenbach H, Hoon DSB, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. **Nat Rev Cancer** 2011b; 11:426-37.

Segal ED, Cha J, Lo J, Falkow S, Tompkins LS. Altered states: involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*. **Proc Natl Acad Sci U.S.A.** 1999; 96:14559-64.

Servetas SL, Bridge DR, Merrell DS. Molecular mechanisms of gastric cancer initiation and progression by *Helicobacter pylori*. **Curr Opin Infect Dis** 2016; 29:304-10.

Shibata D, Weiss LM. Epstein-Barr virus-associated gastric adenocarcinoma. **Am J Pathol** 1992; 140:769-74.

Shimada H. Is “liquid biopsy” useful for assessing HER2 status in gastric cancer? **J Gastroenterol** 2015; 50:119-120.

Shimada H, Noie T, Ohashi M, Oba K, Takahashi Y. Clinical significance of serum tumor markers for gastric cancer: a systematic review of literature by the Task Force of the Japanese Gastric Cancer Association. **Gastric Cancer** 2014; 17:26-33.

Shimizu T, Marusawa H, Matsumoto Y, et al. Accumulation of somatic mutations in TP53 in gastric epithelium with *helicobacter pylori* infection. **Gastroenterology** 2014; 147:407-17.

Shoda K, Ichikawa D, Fujita Y, et al. Monitoring the HER2 copy number status in circulating tumor DNA by droplet digital PCR in patients with gastric cancer. **Gastric Cancer** 2016; 1-10.

Sieren JC, Meyerholz DK, Wang XJ, et al. Development and translational imaging of a TP53 porcine tumorigenesis model. **J Clin Invest** 2014; 124:4052-66.

Sigal A, Rotter V. Oncogenic mutations of the p53 tumor suppressor: The demons of the guardian of the genome. **Cancer Res** 2000; 60:6788-93.

Skaaby T, Husemoen LLN, Thyssen JP, et al. Filaggrin loss-of-function mutations and incident cancer: A population-based study. **Br J Dermatol** 2014; 171:1407-14.

Soh J, Toyooka S, Aoe K, et al. Usefulness of EGFR mutation screening in pleural fluid to predict the clinical outcome of gefitinib treated patients with lung cancer. **Int J cancer** 2006; 119:2353-8.

Strong VE, D'Amico TA, Kleinberg L, Ajani J Impact of the 7th edition AJCC staging classification on the NCCN clinical practice guidelines in oncology for gastric and esophageal cancers. **JNCCN J Natl Compr Cancer Netw** 2013; 11:60-6.

Stroun M, Maurice P, Vasioukhin V, et al. The origin and mechanism of circulating DNA. **Ann N Y Acad Sci** 2000; 906:161-8.

Sukawa Y, Yamamoto H, Noshio K, et al. Alterations in the human epidermal growth factor receptor 2-phosphatidylinositol 3-kinase-v-Akt pathway in gastric cancer. **World J Gastroenterol** 2012; 18:6577-86.

Sun H. Identification of key genes associated with gastric cancer based on DNA microarray data. **Oncol Lett** 2016; 11:525-30.

Tahara T, Shibata T, Okamoto Y, et al. Mutation spectrum of TP53 gene predicts clinicopathological features and survival of gastric cancer. **Oncotarget** 2014; 7:42252-60.

Tan P, Yeoh K-G. Genetics and Molecular Pathogenesis of Gastric Adenocarcinoma. **Gastroenterology** 2015; 149:1153-62.e3.

Thumkeo D, Watanabe S, Narumiya S. Physiological roles of rho and rho effectors in mammals. **Eur J Cell Biol** 2013; 92:303-15.

Tramacere I, Pelucchi C, Bagnardi V, et al. A meta-analysis on alcohol drinking and esophageal and gastric cardia adenocarcinoma risk. **Ann Oncol** 2012; 23:287-97.

Trejo-Becerril C, Pérez-Cárdenas E, Taja-Chayeb L, et al. Cancer progression mediated by horizontal gene transfer in an in vivo model. **PLoS One** 2012; 7:e52754.

Tsujiura M, Ichikawa D, Konishi H, Komatsu S, Shiozaki A, Otsuji E. Liquid biopsy of gastric cancer patients: Circulating tumor cells and cell-free nucleic acids. **World J Gastroenterol** 2014; 20:3265-86.

Venerito M, Nardone G, Selgrad M, Rokkas T, Malfertheiner P. Gastric Cancer-Epidemiologic and Clinical Aspects. **Helicobacter** 2014; 19:32-37.

Waddell T, Verheij M, Allum W, Cunningham D, Cervantes A., Arnold D. Gastric cancer: ESMO-ESSO-ESTRO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Ann Oncol** 2013; 24:vi57-vi63.

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.

Wang Y, Sundfeldt K, Mateoiu C, et al. Diagnostic potential of tumor DNA from ovarian cyst fluid. **Elife** 2016; 5 pii: e15175.

Watanabe Y, Kim HS, Castoro RJ, et al. Sensitive and Specific Detection of Early Gastric Cancer with DNA Methylation Analysis of Gastric Washes. **Gastroenterology** 2009; 136:2149-58.

Watson P, Lynch HT. Extracolonic cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. **Cancer** 1993; 71:677-85.

Wei F, Lin C-C, Joon A, et al. Noninvasive saliva-based EGFR gene mutation detection in patients with lung cancer. **Am J Respir Crit Care Med** 2014; 190:1117-26.

Werner M, Becker KF, Keller G, Höfler H. Gastric adenocarcinoma: pathomorphology and molecular pathology. **J Cancer Res Clin Oncol** 2001; 127:207-16.

Wong SS, Kim K-M, Ting JC, et al. Genomic landscape and genetic heterogeneity in gastric adenocarcinoma revealed by whole-genome sequencing. **Nat Commun** 2014; 5:5477.

Wu W, Chung MCM. The gastric fluid proteome as a potential source of gastric cancer biomarkers. **J Proteomics** 2013; 90:3-13.

Xu H-Y, Xu W-L, Wang L-Q, Chen M-B, Shen H-L. Relationship between P53 status and response to chemotherapy in patients with gastric cancer: a meta-analysis. **PLoS One** 2014; 9:e95371.

Xu Z, Huo X, Ye H, et al. Genetic mutation analysis of human gastric adenocarcinomas using ion torrent sequencing platform. **PLoS One** 2014; 9:e100442.

Yaghoobi M, Bijarchi R, Narod S A. Family history and the risk of gastric cancer. **Br J Cancer** 2010; 102:237-42.

Yao F, Kausalya JP, Sia YY, et al. Recurrent Fusion Genes in Gastric Cancer: CLDN18-ARHGAP26 Induces Loss of Epithelial Integrity. **Cell Rep** 2015; 12:272-85.

Yasui W, Yokozaki H, Fujimoto J, Naka K, Kuniyasu H, Tahara E. Genetic and epigenetic alterations in multistep carcinogenesis of the stomach. **J Gastroenterol** 2000; 35 Suppl 1:111-5.

Yokota T, Kunii Y, Teshima S, et al. Significant prognostic factors in patients with early gastric cancer. **Int Surg** 2000; 85:286-90.

Yokozaki H, Kuniyasu H, Kitadai Y, et al. p53 point mutations in primary human gastric carcinomas. **J Cancer Res Clin Oncol** 1992; 119:67-70.

Zaika AI, Wei J, Noto JM, Peek RM. Microbial Regulation of p53 Tumor Suppressor. **PLoS Pathog** 2015; 11:e1005099.

Zaky AH, Watari J, Tanahe H, et al. Clinicopathologic implications of genetic instability in intestinal-type gastric cancer and intestinal metaplasia as a precancerous lesion: Proof of field cancerization in the stomach. **Am J Clin Pathol** 2008; 129:613-21.

Zhang SY, Zhang SQ, Nagaraju GP, El-Rayes BF. Biomarkers for personalized medicine in GI cancers. **Mol Aspects Med** 2015; 1-14.

Zhao R, Zhang W, Li X, et al. Anaplastic lymphoma kinase (ALK) gene alteration in gastric signet ring cell carcinoma. **Cancer Biomark** 2016; 16:569-74.

Zheng L, Wang L, Ajani J, Xie K. Molecular basis of gastric cancer development and progression. **Gastric Cancer** 2004; 7:61-77.

Zhu L, Qin J, Wang J, Guo T, Wang Z, Yang J Early Gastric Cancer: Current Advances of Endoscopic Diagnosis and Treatment. **Gastroenterol Res Pract** 2016; 2016:1-7.

Zilberstein B, Malheiros C, Lourenco LG, et al. Brazilian consensus in gastric cancer: guidelines for gastric cancer in Brazil. **Arq Bras Cir Dig** 2013; 26:2-6.

Anexo 1 - Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do A.C.CAMARGO CANCER CENTER



Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP

São Paulo, 22 de janeiro de 2015.

Ao
Dr. Emmanuel Dias-Neio
Aluna: **Melissa Pool Pizzi (Mestrado)**

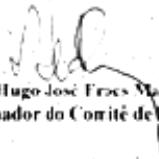
Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1975/14
"Construção e validação de um painel de mutações somáticas em adenocarcinoma gástrico e avaliação de sua utilidade em biópsias líquidas."

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antônio Prudente Hospital do Câncer - A.C. Camargo SP, em sua última reunião de 20/01/2015, após analisarem as respostas aos questionamentos realizados em reunião de 11/11/2014 aprovaram a realização do projeto, o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (versão 2.0) 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;
- Declaração sobre o Plano de Recrutamento dos Sujeitos de Pesquisa, Circunstâncias e Responsáveis pela Obtenção de TCLE;
- Declaração Sobre Uso e Destino do Material Biológico, Publicação dos Dados e Propriedade 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. Cancer Center;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Biobanco;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Anatomia Patológica;
- Declaração de Ciência e Comprometimento de Cirurgia Abdominal;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Centro Internacional de Pesquisa (CIPE);
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Genômica Médica;
- Declaração de Infraestrutura e Instalações do Laboratório de Genômica Médica;
- Cronograma de Trabalho;
- Orçamento Financeiro Detalhado.

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

Atenciosamente,


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

1/1

Anexo 2 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aplicado aos pacientes.



Fundação Antônio Prudente

Rua Professor Antônio Prudente, 211 - 01509-900 - São Paulo – SP. Fone:
2189-5172

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PARTICIPANTE OU RESPONSÁVEL

LEGAL

Nome do

Participante: _____

Documento de identidade nº: _____ Sexo: M() F()

Nascimento: ____/____/____

Endereço: _____ nº _____

Compl. _____ CEP _____

Cidade: _____ Estado: _____ Telefone: _____

DADOS SOBRE O ESTUDO

O presente estudo, intitulado “Construção e validação de um painel de mutações somáticas em adenocarcinoma gástrico e avaliação de sua utilidade em biópsias líquidas”, um projeto de pesquisas do Centro Internacional de Pesquisas e do Núcleo de Cirurgia Abdominal do A.C. Camargo Cancer Center, sob responsabilidade do Dr. Emmanuel Dias-Neto.

EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PARTICIPANTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL

Convidamos você a participar deste estudo que visa encontrar alterações existentes no DNA (material genético encontrado em quase todas as células do nosso corpo) das células do câncer do estômago. Estas alterações serão também buscadas no sangue e no suco gástrico, em uma

tentativa de encontrarmos maneiras alternativas de diagnosticar esta doença e acompanhar a resposta ao tratamento.

Objetivos da pesquisa

Este estudo visa avaliar um conjunto de alterações do DNA, que são frequentemente encontradas nos principais tipos de câncer gástrico. Isto pode ter um impacto positivo no diagnóstico de tumores de estômago, inclusive de modo menos invasivo, através do estudo do sangue e do suco gástrico (que normalmente é coletado durante a endoscopia).

Procedimentos que serão utilizados e propósitos

Caso você aceite participar deste estudo, serão coletadas algumas amostras para análise. Durante o exame de endoscopia, que faz parte dos exames normalmente previstos, o seu estômago será avaliado para busca de eventuais lesões. No exame de endoscopia é feita uma lavagem do interior do estômago, para melhor observação do tecido. Após essa lavagem este líquido é normalmente aspirado e descartado. Se obtivermos a sua autorização, ao invés de descartar este material ele será usado para nossos estudos.

Outro procedimento de rotina é a coleta de um pequeno fragmento do tecido, que é usado para avaliar a existência de doença (biópsia). Caso você autorize, após o uso deste tecido para o diagnóstico, iremos estudar se existem alterações de DNA nesta amostra. Do mesmo modo, caso você autorize, coletaremos um pequeno volume de sangue (cerca de 15 mL), antes de qualquer tratamento (cirurgia, radioterapia ou quimioterapia), para avaliarmos se estas alterações do DNA tumoral também podem ser vistas no sangue. Gostaríamos também de fazer outras coletas de sangue e suco gástrico após o seu tratamento, caso este venha a ser feito, quando avaliaremos se as alterações de DNA que porventura sejam encontradas na biópsia ainda serão detectáveis no sangue. Estas coletas serão feitas durante a outras endoscopias que sejam indicadas, ou em outro momento durante suas visitas de rotina ao hospital.

Caso aceite participar do estudo você deverá:

- Ter mais de 30 anos de idade;

- Ter indicação de endoscopia;

Quando você receber este formulário, iremos explicar a você e a seus familiares quais as razões da pesquisa, seus objetivos e que os dados obtidos serão usados exclusivamente em pesquisa científica.

Caso concorde em participar, por favor assine este Termo de Consentimento em 2 vias. Uma ficará em seu poder e a outra será arquivada pelo pesquisador.

Esclarecemos ainda que você tem toda a liberdade de participar ou não do estudo, e sua decisão, seja ela qual for, não afetará de nenhum modo o seu tratamento. Caso você concorde, esta será uma colaboração voluntária, não havendo nenhuma forma de remuneração por isto. Do mesmo modo, esta decisão não afeta de nenhum modo o que será cobrado de você ou de sua seguradora de saúde durante o tratamento. A qualquer momento, mesmo que você já tenha concordado em participar e fornecido a sua assinatura, você tem toda a liberdade de desistir e solicitar o descarte das amostras, sem que isso ocasione qualquer prejuízo a você ou ao seu tratamento.

Complicações e riscos esperados

A participação neste estudo não implica em riscos adicionais, além daqueles associados com a realização do exame endoscópico que já faz parte da rotina dos seus exames. As raras complicações associadas à endoscopia compreendem: pequeno sangramento no local da biópsia, mas este não deve causar nenhum mal estar ao participante, e perfuração da parede estomacal durante o procedimento. O material utilizado nesse estudo é gerado normalmente pelo procedimento endoscópico, mas ao invés de ser descartado este será armazenado para análise. Em relação a coleta de sangue, esta será feita por profissional treinado seguindo procedimento padrão. Como regra geral, não será necessário fazer uma punção venosa (furo com agulha no seu braço) específica para este projeto, pois o sangue é coletado pelo acesso venoso usado na administração da medicação que você recebe na preparação para a endoscopia. Os riscos que podem acontecer no local da coleta de sangue são tontura e/ou dor, podendo resultar posteriormente em um hematoma. Todos os dados levantados serão

Anexo 3 - Iniciadores utilizados para a construção das bibliotecas do AmpliSeq.

FORWARD Pool 1	TTCAACTGUGCAATAGTUA AACCCAT	REVERSE Pool 1	CTGAGGTCUGGTTTGAACUGGG
FORWARD Pool 1	GTGCTTCUGACGCACACCTATUG	REVERSE Pool 1	CATGTUCAAGACAGAAGGGCCUGA
FORWARD Pool 1	GAAATCGGUAAGAGGUGGGCCAG	REVERSE Pool 1	CCACTACAACUACATGTGTAACAGTUCC
FORWARD Pool 1	GGAATCCTAUGGCTTTCCAACCUAG	REVERSE Pool 1	AGAGCTGAAUGAGGCCTUGGA
FORWARD Pool 1	GTGCTGTGACUGCTTGTAGAUGGC	REVERSE Pool 1	CCTGACTTTCAACUCGTCTCCTTCCUC
FORWARD Pool 1	AAAACGGCATTUGAGTGTAGACUGGA	REVERSE Pool 1	TTTCCTTGCCUCTTTCTAGCACUG
FORWARD Pool 1	GAAAGCCAAAGGGUGAAGAGAAUCCC	REVERSE Pool 1	AAGTCTGTGACTUGCACGGTCAGTUG
FORWARD Pool 1	CCCCAGUCCAACCCUTGTCCUT	REVERSE Pool 1	AGCCCCUAGCAGAGACCUAG
FORWARD Pool 1	CATAACTGCACCCUTGGTCTCCUC	REVERSE Pool 1	AACAGCTTUGAGGTGCGTGTUG
FORWARD Pool 1	GTAGCTGCCUGGTAGGTTTUC	REVERSE Pool 1	CACUGAAGACCCAGGUCCAGAT
FORWARD Pool 1	TCATCCAATACUCCACACGCAAATTUC	REVERSE Pool 1	CGTGCUCAGATAGCGAUG
FORWARD Pool 1	CAGGCTAGGCUAAGCTATGATGTTCTUAGA	REVERSE Pool 1	TTGTTAAAGAGAGCAUGAAAATGGTUCT
FORWARD Pool 2	AGTCTTCCAGUGTGATGATGGUGAG	REVERSE Pool 2	CTUGCCACAGGTCUCCCAAGG
FORWARD Pool 2	GGCATUGAAGTCTCAUGGAAGCCA	REVERSE Pool 2	TCCTGGCCCCUGTCATCTTCUGT
FORWARD Pool 2	GGGAACAAGAAGUGGAGAATGUCAG	REVERSE Pool 2	ATGTGATGTCATCUCTCCTCCCTGCUT
FORWARD Pool 2	AAAACAUCTTGTUGAGGGCAGGG	REVERSE Pool 2	CTGAGGTGUAGACGCCAACTCUC
FORWARD Pool 2	ATCGTAAGTCAAGUAGCATCTGTAUCA	REVERSE Pool 2	GCTCCTGGTTGUAGTAACTAUCTUC
FORWARD Pool 2	AGAGGAGCUGGTGTGTUGGG	REVERSE Pool 2	CUAAGCGAGGUAAGCAAGCAGGAC
FORWARD Pool 2	CCACUGACAACCACCTUAACCC	REVERSE Pool 2	TCTGCCCCUUCTCAGCAUCT
FORWARD Pool 2	GGAGCAGCCUCTGGCATTUCG	REVERSE Pool 2	TCTGACTGCUCTTTTACCCAUUC
FORWARD Pool 2	CTGCCCTTCCAUGGATCCACUC	REVERSE Pool 2	AGGGTTGGAAGUGTCTCATGCUGGA
FORWARD Pool 2	CCTTCTTGCGGAGAUTCTTCCUCT	REVERSE Pool 2	GGACAGGUAGGACCTGATTCCTUC
FORWARD Pool 2	TCCAGCCCCAGCUGCUCAC	REVERSE Pool 2	TUGCCAACUGGCCAAGACCT
FORWARD Pool 2	CTTCCCAGCCUGGGCATCCUT	REVERSE Pool 2	AACCATCTTTTAAACUCAGGTA

Anexo 4 - Valores estatísticos para o filtro de ruído de variação posicional, para todos os tipos de amostras.

Amostra	Trio	Média (%)	Desvio padrão (%)	M+D(%)	M+2D(%)
FFPE	AAA	0,16	0,45	0,61	1,06
FFPE	AAC	0,17	0,22	0,39	0,61
FFPE	AAG	0,20	0,35	0,55	0,90
FFPE	AAT	0,15	0,28	0,43	0,72
FFPE	ACA	0,29	0,78	1,08	1,86
FFPE	ACC	0,31	0,94	1,26	2,20
FFPE	ACG	0,47	2,43	2,90	5,33
FFPE	ACT	0,26	1,11	1,36	2,47
FFPE	CAA	0,13	0,25	0,38	0,63
FFPE	CAC	0,13	0,11	0,24	0,35
FFPE	CAG	0,13	0,17	0,30	0,47
FFPE	CAT	0,13	0,36	0,50	0,86
FFPE	CCA	0,22	0,81	1,03	1,84
FFPE	CCC	0,31	0,96	1,27	2,23
FFPE	CCG	0,34	0,81	1,15	1,96
FFPE	CCT	0,22	0,62	0,84	1,46
FFPE	GAA	0,20	0,48	0,69	1,17
FFPE	GAC	0,22	0,41	0,63	1,03
FFPE	GAG	0,25	0,61	0,86	1,47
FFPE	GAT	0,15	0,19	0,34	0,53
FFPE	GCA	0,17	0,46	0,63	1,09
FFPE	GCC	0,17	0,43	0,60	1,03
FFPE	GCG	0,19	0,54	0,73	1,26
FFPE	GCT	0,16	0,44	0,60	1,05
FFPE	TAA	0,08	0,07	0,15	0,23
FFPE	TAC	0,16	0,32	0,47	0,79
FFPE	TAG	0,10	0,08	0,18	0,26
FFPE	TAT	0,10	0,41	0,51	0,92
FFPE	TCA	0,22	0,48	0,70	1,19
FFPE	TCC	0,28	0,90	1,18	2,08
FFPE	TCG	0,43	0,97	1,40	2,37
FFPE	TCT	0,21	0,64	0,85	1,50
Média		0,21	0,57	0,78	1,34
leuco	AAA	0,08	0,06	0,14	0,20
leuco	AAC	0,11	0,08	0,19	0,27
leuco	AAG	0,12	0,11	0,23	0,34
leuco	AAT	0,08	0,08	0,17	0,25
leuco	ACA	0,05	0,05	0,10	0,15
leuco	ACC	0,06	0,08	0,14	0,23
leuco	ACG	0,05	0,05	0,10	0,15
leuco	ACT	0,04	0,03	0,06	0,09
leuco	CAA	0,09	0,08	0,17	0,24

leuco	CAC	0,09	0,07	0,16	0,23
leuco	CAG	0,09	0,08	0,17	0,25
leuco	CAT	0,09	0,15	0,25	0,40
leuco	CCA	0,05	0,04	0,09	0,13
leuco	CCC	0,05	0,04	0,09	0,14
leuco	CCG	0,08	0,08	0,16	0,24
leuco	CCT	0,08	0,20	0,28	0,49
leuco	GAA	0,12	0,09	0,21	0,29
leuco	GAC	0,13	0,09	0,22	0,32
leuco	GAG	0,13	0,14	0,26	0,40
leuco	GAT	0,11	0,09	0,20	0,28
leuco	GCA	0,06	0,04	0,09	0,13
leuco	GCC	0,07	0,06	0,12	0,18
leuco	GCG	0,07	0,05	0,12	0,16
leuco	GCT	0,05	0,04	0,09	0,13
leuco	TAA	0,06	0,04	0,10	0,14
leuco	TAC	0,07	0,07	0,14	0,21
leuco	TAG	0,07	0,05	0,12	0,17
leuco	TAT	0,05	0,04	0,09	0,13
leuco	TCA	0,04	0,03	0,07	0,10
leuco	TCC	0,06	0,08	0,14	0,22
leuco	TCG	0,06	0,04	0,10	0,14
leuco	TCT	0,05	0,10	0,14	0,24
Média		0,08	0,07	0,15	0,22
PL	AAA	0,11	0,08	0,19	0,27
PL	AAC	0,14	0,10	0,24	0,34
PL	AAG	0,16	0,13	0,29	0,41
PL	AAT	0,10	0,08	0,17	0,25
PL	ACA	0,07	0,11	0,18	0,29
PL	ACC	0,09	0,12	0,21	0,33
PL	ACG	0,06	0,05	0,11	0,16
PL	ACT	0,05	0,04	0,10	0,14
PL	CAA	0,11	0,08	0,19	0,27
PL	CAC	0,11	0,08	0,20	0,28
PL	CAG	0,12	0,10	0,22	0,31
PL	CAT	0,13	0,20	0,33	0,52
PL	CCA	0,06	0,06	0,12	0,18
PL	CCC	0,07	0,05	0,12	0,17
PL	CCG	0,13	0,73	0,87	1,60
PL	CCT	0,08	0,08	0,16	0,25
PL	GAA	0,15	0,10	0,25	0,36
PL	GAC	0,17	0,11	0,28	0,39
PL	GAG	0,16	0,13	0,29	0,42
PL	GAT	0,14	0,12	0,26	0,38
PL	GCA	0,07	0,05	0,13	0,18
PL	GCC	0,09	0,08	0,16	0,24

PL	GCG	0,09	0,06	0,15	0,21
PL	GCT	0,07	0,05	0,13	0,18
PL	TAA	0,09	0,07	0,16	0,23
PL	TAC	0,11	0,11	0,22	0,33
PL	TAG	0,10	0,06	0,16	0,22
PL	TAT	0,08	0,06	0,13	0,19
PL	TCA	0,05	0,05	0,10	0,15
PL	TCC	0,07	0,08	0,15	0,23
PL	TCG	0,08	0,06	0,14	0,20
PL	TCT	0,07	0,11	0,18	0,29
Média		0,10	0,11	0,21	0,31
LG	AAA	0,10	0,11	0,22	0,33
LG	AAC	0,12	0,12	0,23	0,35
LG	AAG	0,14	0,17	0,30	0,47
LG	AAT	0,09	0,13	0,22	0,35
LG	ACA	0,05	0,08	0,14	0,22
LG	ACC	0,08	0,26	0,34	0,59
LG	ACG	0,08	0,12	0,19	0,31
LG	ACT	0,06	0,22	0,28	0,51
LG	CAA	0,09	0,08	0,17	0,26
LG	CAC	0,09	0,12	0,22	0,34
LG	CAG	0,10	0,13	0,22	0,35
LG	CAT	0,10	0,19	0,29	0,49
LG	CCA	0,07	0,26	0,33	0,58
LG	CCC	0,06	0,06	0,12	0,18
LG	CCG	0,16	0,60	0,76	1,36
LG	CCT	0,08	0,25	0,33	0,58
LG	GAA	0,15	0,61	0,76	1,38
LG	GAC	0,14	0,22	0,36	0,58
LG	GAG	0,14	0,20	0,34	0,54
LG	GAT	0,11	0,09	0,20	0,30
LG	GCA	0,06	0,05	0,11	0,17
LG	GCC	0,07	0,07	0,14	0,21
LG	GCG	0,08	0,06	0,14	0,21
LG	GCT	0,11	0,86	0,97	1,82
LG	TAA	0,07	0,09	0,16	0,24
LG	TAC	0,10	0,34	0,44	0,78
LG	TAG	0,07	0,06	0,13	0,19
LG	TAT	0,06	0,04	0,10	0,15
LG	TCA	0,04	0,08	0,13	0,21
LG	TCC	0,07	0,17	0,24	0,42
LG	TCG	0,11	0,57	0,68	1,25
LG	TCT	0,08	0,64	0,71	1,35
Média		0,09	0,22	0,31	0,53
B	AAA	0,10	0,07	0,16	0,23
B	AAC	0,14	0,70	0,84	1,54

B	AAG	0,13	0,14	0,28	0,42
B	AAT	0,09	0,07	0,15	0,22
B	ACA	0,08	0,83	0,91	1,74
B	ACC	0,07	0,16	0,23	0,40
B	ACG	0,06	0,07	0,13	0,20
B	ACT	0,04	0,03	0,07	0,09
B	CAA	0,10	0,08	0,18	0,26
B	CAC	0,09	0,07	0,16	0,24
B	CAG	0,10	0,08	0,18	0,26
B	CAT	0,12	0,26	0,38	0,64
B	CCA	0,07	0,27	0,33	0,60
B	CCC	0,06	0,04	0,10	0,15
B	CCG	0,14	0,77	0,91	1,69
B	CCT	0,07	0,11	0,18	0,29
B	GAA	0,13	0,09	0,22	0,31
B	GAC	0,13	0,10	0,23	0,34
B	GAG	0,14	0,11	0,24	0,35
B	GAT	0,12	0,10	0,23	0,33
B	GCA	0,06	0,04	0,10	0,15
B	GCC	0,07	0,06	0,13	0,20
B	GCG	0,10	0,45	0,55	1,01
B	GCT	0,06	0,04	0,10	0,14
B	TAA	0,06	0,04	0,11	0,15
B	TAC	0,08	0,09	0,17	0,26
B	TAG	0,08	0,05	0,13	0,18
B	TAT	0,06	0,04	0,10	0,14
B	TCA	0,04	0,03	0,08	0,11
B	TCC	0,06	0,08	0,14	0,22
B	TCG	0,06	0,04	0,10	0,15
B	TCT	0,05	0,12	0,17	0,29
Média		0,09	0,16	0,25	0,41

Anexo 5 - Tabela com informações sobre frequência mutacional e concentração de DNA total para cada paciente, antes e após o tratamento.

Paciente	Freq da Mut no T	Presença da Mut no LG 1	C no LG (ng/μl)	Freq da Mut no LG 1	Presença da Mut no PL 1	C no PL (ng/μl)	Freq da Mut no PL 1	Presença da Mut no LG	C no LG (ng/μl)	Freq da Mut no LG	Presença da Mut no PL 2	C no PL (ng/μl)	Freq da Mut no PL 2
1	7,57	+	175	1,16	+	2,3	14,40	SS			SS		
2	7,01	-	3,1		+	4,0	1,03	SS			SS		
3	9,84	+	9,5	1,83	-	6,46		+	798	46,83	-	1,64	
4	12,75	-	0,162		+	1,1	3,00	-	83,2		+	6,6	2,50
5	9,56	-	7,92		-	0,882		-	47		-	1,01	
6	5,43	+	8,3	4,63	+	0,3	2,53	SS			SS		
7	2,81	-	2,7		-	0,774		SS			SS		
8	23,54	+	116	1,76	-	0,518		SS			SS		
9	10,14	+	61,6	8,61	+	0,3	1,29	-	81,2		-	5,78	
10	9,64	-	ND		-	1,84		SS			SS		
11	8,90	-	164		-	7,58		SS			SS		
12	45,63	+	8,0	4,41	+	86,2	73,71	SS			SS		
13	1,50	-	5,78		-	1,07		SS			SS		
14	6,01	-	2,46		-	0,608		ND	ND		-	0,432	
15	3,04	+	106	0,50	-	1,09		ND	ND		-	1,36	

Legenda: Mut- Mutação; Freq- Frequência; T- Biópsia tumoral; LG- LG; LG1- LG pré tratamento; LG 2- LG pós tratamento; C- Concentração; PL- Plasma; PL1- Plasma pré tratamento; PL 2- Plasma pós tratamento; ND- Amostra não disponível.