

O Uso do Sequenciamento Total do Exoma no Diagnóstico do Adenocarcinoma Ductal Pancreático

doi: <https://doi.org/10.32635/2176-9745.RBC.2023v69n1.3006>

Using Whole Exome Sequencing on Diagnosis of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma

El uso de la Secuenciación del Exoma Total en el Diagnóstico del Adenocarcinoma Ductal Pancreático

Jacques de Oliveira Bernardes¹; Guilherme Toledo-Silva²

Resumo

Introdução: O adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC) é uma doença agressiva responsável no Brasil por 2% das neoplasias e 5% das mortes por câncer. A análise do exoma – parte do DNA que codifica as proteínas – permite identificar as variantes somáticas do tumor e as germinativas do paciente. Essa informação é necessária para implementar a terapia-alvo para o PDAC, pois fornece evidência para selecionar, ou excluir, tratamentos para a doença. **Objetivo:** Identificar as variantes de interesse clínico e farmacológico presentes no PDAC de quatro pacientes, por meio da técnica de sequenciamento total do exoma (WES). **Método:** Foram utilizados dados públicos de quatro amostras de pares tumor-normal de PDAC, localizados na cabeça do pâncreas de pacientes caucasianos, estágio T3N1M0, sequenciadas e publicizadas pelo *Texas Cancer Research Biobank*. Para identificar as variações somáticas e germinativas, utilizou-se o *software* GATK. As consequências clínicas e farmacológicas dessas variações foram anotadas por meio do *software* VEP e analisadas mediante o *software* estatístico R. **Resultados:** Dos quatro tumores, um possui variante estrutural com duplicação do gene AKT2; outro, variantes nos genes da via das ciclinas CDK14 e CDKN2C, o que altera o regime quimioterápico; na linhagem germinativa, um paciente tem variantes no gene XRCC1, que sugere aumento da resposta à platina. **Conclusão:** Embora a patologia classifique todos os tumores como PDAC, cada paciente – bem como o respectivo tumor – apresenta especificidades que afetam o diagnóstico e as possibilidades terapêuticas. O WES permite identificá-las a um custo baixo, o que amplia as possibilidades de tratamento do PDAC.

Palavras-chave: carcinoma ductal pancreático; sequenciamento completo do exoma; terapia de alvo molecular.

ABSTRACT

Introduction: The prevalence of pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) in Brazil is around two percent of all neoplasms. It is an aggressive disease responsible for five percent of all deaths by cancer. The analysis of exome – part of the DNA encoding the proteins – allows the identification of tumor-specific variants and the patient polymorphism. This information is necessary to implement target therapy for PDAC, as it provides evidence to select, or exclude, PDAC treatments. **Objective:** Identify the somatic and germinative variants of clinical and pharmacological interest in the PDAC for four patients through the whole-exome sequencing technique (WES). **Method:** Public sequencing exome data published by Texas Cancer Research Biobank were utilized, from four tumor-normal samples pair of PDAC located in the pancreas head of Caucasian patients, T3N1M0 stage. To identify somatic and germinative variations, the GATK software was adopted. Furthermore, these variants were noted with their clinical and pharmacological information through the VEP software and its consequences were analyzed through the statistical software R. **Results:** Of the four tumors, one has a structural variant with duplication of the AKT2 gene; another, changes in the pathway of cyclins CDK14 and CDKN2C. Both findings alter the chemotherapy regimen; in the germline, one patient has variants in the XRCC1 gene, which suggests increased response to platinum. **Conclusion:** Although the pathology classifies all tumours as PDAC, each patient – as well as their respective tumor – shows specificities that affect the diagnosis and therapeutic possibilities. WES allows to identify them at a low cost, expanding the treatment possibilities of PDAC.

Key words: carcinoma, pancreatic ductal; whole exome sequencing; molecular targeted therapy.

RESUMEN

Introducción: El adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC) es una enfermedad agresiva que causa en Brasil 5% de las muertes por cáncer. El análisis del exoma – parte del ADN que codifica las proteínas – permite la identificación de mutaciones específicas del tumor, así como los polimorfismos del paciente. Esta información es necesaria para implementar la terapia dirigida para PDAC. **Objetivo:** Identificar las variaciones de interés clínico y farmacológico presentes en el PDAC de cuatro pacientes, mediante la técnica secuenciación del exoma completo (WES). **Método:** Se utilizaron datos públicos de cuatro muestras de pares de tumores normales (T-N) de PDAC, localizados en la cabeza del páncreas de pacientes caucásicos, estadio T3N1M0, secuenciadas y publicadas por *Texas Cancer Research Biobank*. Para identificar las variaciones somáticas y germinativas, se utilizó el *software* GATK. Se observaron las consecuencias clínicas y farmacológicas de estas variaciones a través del *software* VEP. Y analizadas sus consecuencias a través del *software* estadístico R. **Resultados:** De los cuatro tumores, uno tiene una variante estructural con duplicación del gen AKT2; otro, cambios en la vía de las ciclinas CDK14 y CDKN2C, que altera el régimen de quimioterapia; en el linaje germinal, un paciente tiene variantes en el gen XRCC1, lo que sugiere una mayor respuesta al platino. **Conclusión:** Aunque la patología clasifica todos los tumores como PDAC, cada paciente – así como el tumor respectivo – presenta especificidades que afectan el diagnóstico y las posibilidades terapéuticas. WES le permite identificarlos a un bajo costo, lo que amplía las posibilidades de tratamiento de PDAC.

Palabras clave: carcinoma ductal pancreático; secuenciación del exoma completo; terapia molecular dirigida.

^{1,2}Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética. Florianópolis (SC), Brasil. E-mails: jacques.bernardes@gmail.com; guilherme.toledo@ufsc.br. Orcid ID: <https://orcid.org/0000-0002-5162-5444>; Orcid ID: <https://orcid.org/0000-0002-9953-2861>

Endereço para correspondência: Guilherme de Toledo e Silva. UFSC, Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética. Av. Prof. Henrique da Silva Fontes, 2754-2994 – Trindade. Florianópolis (SC), Brasil. CEP 88040-900. E-mail: guilherme.toledo@ufsc.br



INTRODUÇÃO

O adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC) tem comportamento agressivo e de difícil diagnóstico, apresentando, portanto, uma alta mortalidade; é responsável, no Brasil, por 2% das neoplasias e 4% das mortes por câncer¹. Nos Estados Unidos, a taxa de sobrevida em cinco anos para o PDAC está em 9%². Apesar dos avanços no tratamento, as taxas de mortalidade pelo PDAC seguem em elevação^{2,3}, o que sugere a necessidade de uma nova abordagem para o cuidado dessa doença.

Macroscopicamente, o PDAC se apresenta como uma tumoração de cor acinzentada, textura rígida e forma estrelada. Microscopicamente, desencadeia uma intensa reação desmoplásica, com um denso estroma fibrótico a envolver as células neoplásicas⁴. Clinicamente, o paciente acometido pelo PDAC apresenta sintomas inespecíficos como anorexia, astenia, dor abdominal e perda ponderal⁵.

O diagnóstico ocorre com o estadiamento clínico, realizado por meio de exames de imagem e laboratoriais, seguido do estadiamento patológico. O estadiamento clínico envolve tomografia computadorizada (TC) torácica e pélvica, ultrassonografia (US) endoscópica, ressonância magnética (RM, nas lesões com indefinição na TC), tomografia por emissão de pósitrons (PET-CT, para identificar metástases) e colangiopancreatografia reversa endoscópica (CPRE, nas obstruções dos ductos biliares e colédoco); testes da função hepática e antígeno de câncer 19-9 (CA19-9). Esse estadiamento localiza as lesões (cabeça, corpo ou cauda do pâncreas) e as classifica (ressecáveis, *borderline* ou irressecáveis). As lesões ressecáveis são encaminhadas para cirurgia, sem a necessidade de biópsia prévia confirmatória da malignidade. Nas lesões *borderline* e irressecáveis, a biópsia é necessária para o início da radioterapia e quimioterapia⁶.

Na sequência, o diagnóstico prossegue com o estadiamento patológico, a partir do material coletado por meio da ressecção cirúrgica ou da biópsia. Nessa fase, faz-se a classificação TNM, que avalia o tamanho (T), o comprometimento dos linfonodos (N) e a existência de metástases (M), bem como a localização do tumor no órgão, o tipo e o grau de diferenciação histológico⁷, o que permite traçar o prognóstico e o tratamento.

Embora amplamente adotada, essa abordagem diagnóstica apresenta limitações, em virtude da baixa especificidade do estadiamento clínico⁸ e da baixa sobrevida em cinco anos após a aplicação da terapia, mesmo nas condições ideais de lesões ressecáveis, com margens livres (R0) e localizadas no pâncreas (T1), cujos pacientes têm sobrevida média de 27 meses⁹. Esse dado reforça a necessidade de novas abordagens para o diagnóstico e tratamento dessa doença.

Sabendo-se que o câncer é uma doença genética¹⁰, causada por mutações somáticas responsáveis pelo fenótipo observado nas células malignas, o entendimento dessas mutações, incluindo as variantes somáticas adquiridas nas células tumorais, bem como os polimorfismos herdados – ou variantes germinativas¹¹ –, é de fundamental importância para a ampliação do conhecimento do câncer de pâncreas e pode levar a manejos diferenciados da doença, melhorando o prognóstico.

Uma das técnicas moleculares¹² já consagradas é o sequenciamento total do exoma (WES), com a qual se sequencia apenas a parte do genoma responsável pela codificação das proteínas, o exoma¹³. Por meio dele, é possível identificar as variantes somáticas no DNA do tecido tumoral e as variantes germinativas das células sanguíneas brancas (tecido normal) do paciente.

Essas variantes são de diversos tipos: polimorfismos ou mutações em uma base nitrogenada do genoma (SNP), pequenas inserções ou deleções de algumas bases nitrogenadas no genoma (INDEL), ou grandes alterações estruturais do genoma, envolvendo milhares de bases nitrogenadas (SV). As alterações resultantes ocorrem nas estruturas e funções das proteínas que atuam no funcionamento das células, conduzindo ao fenótipo do tumor¹⁴. Identificá-las amplia as possibilidades diagnósticas e terapêuticas para o câncer¹⁵.

Estudos de associação genômica (GWAS) envolvendo o PDAC mostraram poucas variantes somáticas típicas em alguns oncogenes e genes supressores de tumor – KRAS, TP53, SMAD4 e CDKN2A – e uma diversidade de variantes menos prevalentes em outros genes. Esse padrão confere uma alta especificidade a cada PDAC e sugere uma explicação para a baixa resposta às terapias convencionais padronizadas. Essas características abrem a possibilidade de abordar o PDAC por meio de terapias-alvo mais específicas. Na linhagem germinativa, esses estudos identificaram variantes associadas a um maior risco para o PDAC: BRCA1, BRCA2, PALB2, STK11, CDKN2A, ATM, PRSS1, MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, EPCAM e TP53¹⁶.

Tais estudos mostraram que as células tumorais de PDAC com variantes nos genes BRCA1, BRCA2 e PALB2, envolvidos no reparo do DNA, possuem genoma estruturalmente muito instável¹⁷ e apresentam boa resposta à platina conjugada com inibidores de poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)¹⁸. Como indicador prognóstico, entre os pacientes com PDAC que expressam as proteínas metastáticas S100A2 e S100A4 de forma aberrante, 50% morrem em até um ano após a ressecção do tumor, o que contraindicaria a cirurgia nesses pacientes em virtude da sua alta morbidade e do baixo benefício¹⁹.

A terapia sistêmica é utilizada em todos os estágios do PDAC. O FOLFIRINOX²⁰, regime quimioterápico

resultante da combinação dos fármacos ácido folínico, fluorouracila, irinotecano e oxaliplatina, ou a combinação de gencitabina mais capecitabina, são os fármacos de escolha⁶. Nesse contexto, aspectos relacionados à farmacodinâmica das substâncias utilizadas no tratamento sistêmico também são afetadas pelas variantes germinativas do paciente. A fluorouracila e capecitabina são afetadas pelos polimorfismos do gene dihydropyrimidine dehydrogenase (DPYD)²¹ e o irinotecano por polimorfismos no gene UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A1 (UGT1A1)²², ambos com grau de evidência máxima (1A) na *Pharmacogenomics Knowledge Base* (PharmGBK)²³, ou seja, necessitam de análise das variantes germinativas para a sua prescrição. Para a fluorouracila, pacientes que apresentam polimorfismos que diminuem a atividade da enzima dipirimidina desidrogenase apresentam risco de intoxicação pelo FOLFIRINOX²¹. No caso do irinotecano, os polimorfismos levam a uma menor eficácia da substância e uma maior toxicidade²⁴.

Este trabalho objetiva mostrar o uso do WES para identificar as mutações somáticas e germinativas de interesse clínico e farmacológico presentes no PDAC de quatro pacientes, sequenciadas por meio da técnica WES. A abordagem prática e objetiva exposta constrói uma ponte entre a atual forma para o seu diagnóstico e tratamento e aquela preconizada pela terapia-alvo, a fim de facilitar a sua compreensão, difusão e implementação pelas equipes e instituições envolvidas no cuidado. O principal beneficiado é o paciente, que tem ampliadas suas chances diante de um mal cujas estatísticas de sobrevida permanecem inertes por mais de 40 anos.

MÉTODO

Para demonstrar o uso do WES no diagnóstico e tratamento do PDAC, este artigo fez uso de dados públicos de sequenciamento de quatro amostras de pares tumor-normal (T-N) de PDAC, localizados na cabeça do pâncreas de pacientes caucasianos, estágio T3N1M0, sequenciadas em máquinas *Illumina*, e publicizadas em arquivos digitais na Internet pelo *Texas Cancer Research Biobank* (TCRB)²⁵. Os indivíduos acometidos pelo PDAC e cujos exomas tornaram-se públicos pelo TCRB foram incluídos neste trabalho.

A identificação dos SNP e INDEL de linhagem germinativa e somática envolve sucessivas etapas de processamento dos dados. Inicialmente as sequências produzidas pelas máquinas de sequenciamento *Illumina* são alinhadas a um genoma de referência, para, em seguida, identificar as variantes germinativas e somáticas existentes nas amostras normal e tumoral e, por fim, anotá-las com informações dos seus efeitos fenotípicos e clínicos.

Cada uma dessas etapas demanda diferentes *softwares* executados em sequência, de modo que a saída de um constitui a entrada do seguinte; juntos constituem-se em um *pipeline* cujo resultado são as variantes e mutações existentes naquele tecido normal ou tumoral, anotadas com as informações necessárias à sua compreensão, por exemplo, o nome do gene, da proteína alterada, do tipo de alteração e as suas consequências clínicas, entre outras informações.

Na etapa de alinhamento, o *software Burrows-Wheeler Aligner* (BWA)²⁶ alinha os segmentos de 100 bases (*reads*) gerados pelos sequenciadores *Illumina* a um genoma de referência, GRCh38, reconstruindo assim o genoma da amostra. Os arquivos digitais contendo os dados de sequenciamento e o genoma alinhado estão no formato FASTQ e BAM, respectivamente. Ao final, o *software FastQC*²⁷ avalia a qualidade dos arquivos BAM gerados.

Em seguida, na etapa de identificação das variações somáticas, o *software Mutect2*²⁸ compara os arquivos BAM contendo os genomas das amostras de tecidos normais e tumorais do paciente, de modo a identificar, classificar, filtrar e listar as variantes somáticas presentes na amostra tumoral, salvando-as em um arquivo digital no formato VCF. Essas variantes são do tipo SNP e INDEL presentes nas células tumorais: inserções, deleções e trocas de bases. Analogamente, para as variantes germinativas, o *software GATK*²⁹ compara o genoma do tecido normal ao genoma de referência e identifica os SNP e INDEL nele presentes. Na identificação das alterações estruturais, usou-se o *software R* com a biblioteca CopywriteR³⁰. A qualidade das variantes encontradas, somáticas e germinativas, é verificada com o *software Bcftools*³¹.

Na etapa de anotação das variantes somáticas e germinativas, o *software Variant Effect Predictor* (VEP)³² analisa as variantes identificadas na etapa anterior e anota as consequências fenotípicas dessas variantes, por exemplo, o gene onde ela ocorreu, o tipo de variação e as suas consequências para o paciente.

Por fim, as anotações feitas pelo VEP são pesquisadas na literatura para identificar potenciais alvos terapêuticos para a doença.

A execução dos *softwares* citados ocorreu nas respectivas configurações padrão; nas análises, as variantes sem o atributo "PASS" no campo *filter* do arquivo VCF foram filtradas e excluídas. O atributo "PASS" é atribuído a todos as variantes que atendam, cumulativamente, aos requisitos padrão de qualidade dos *softwares* supracitados.

Em conformidade com as Resoluções n.º 466/2012³³ e n.º 510/2016³⁴, este estudo fica isento de aprovação por um Comitê de Ética em Pesquisa, uma vez que utiliza dados de origem pública sem qualquer identificação de sujeitos.

RESULTADOS

Os dados clínicos dos pacientes incluídos neste estudo estão listados na Tabela 1. Todos os tumores são do tipo adenocarcinoma ductal infiltrativo.

Os tumores estavam localizados na cabeça do pâncreas, possuíam estágio T3, o que indicou que o tumor cresceu para além da glândula pancreática, N1, com acometimento de linfonodos, M0, e sem metástases, com exceção do paciente TCRBOA5 em quem não pôde ser determinada a presença ou ausência de metástase.

A qualidade do WES das amostras normal e tumoral é adequada, conforme análise do *software* FastQC²⁷: todas com mais de 51 milhões de sequências de 101 bases, com conteúdo CG entre 45% e 46% e sem bases de baixa qualidade. Como consequência, o BWA²⁶ realizou um bom alinhamento ao genoma de referência, GRCh38, conforme mostra a Tabela 2.

Após o alinhamento, na etapa de identificação de variantes, os *softwares* GATK e Mutec2 encontraram 123.174 variantes, sendo 87.170 germinativas e 36.004 somáticas. Os dados por paciente, amostra e tipo de tecido estão na Tabela 3.

Tabela 1. Dados clínicos dos pacientes

Identificação do Paciente	Sexo	Faixa etária (anos)	Etnia	Estadiamento TNM	Celularidade tumoral na amostra (%)	Localização do tumor	Grau do tumor
TCRBOA1	Masculino	51-60	Branco, não hispânico ou latino	T3N1M0	10	Cabeça do pâncreas	II
TCRBOA2	Feminino	61-70	Branco, não hispânico ou latino	T3N1M0	60	Cabeça do pâncreas	II
TCRBOA3	Masculino	51-60	Branco, não hispânico ou latino	T3N1M0	20	Cabeça do pâncreas	II
TCRBOA5	Masculino	51-60	Branco, não hispânico ou latino	T3N1MX	5	Cabeça do pâncreas	II

Legenda: TCRBOA = *Texas Cancer Research Biobank Open Access*.

Nota: A coluna celularidade tumoral na amostra indica o percentual do tecido da amostra que corresponde ao tumor. No paciente TCRBOA5, apenas 5% do tecido é tecido tumoral.

Tabela 2. Qualidade do alinhamento por amostra

Amostra	Quantidade total de reads	Quantidade de reads alinhados	Quantidade e reads não alinhados	Percentual de reads alinhados
TCRBOA1-N	81.258.689	80.777.836	480.853	99,41%
TCRBOA1-T	86.680.285	86.259.605	420.680	99,51%
TCRBOA2-N	97.446.346	96.650.302	796.044	99,18%
TCRBOA2-T	104.905.565	104.270.211	635.354	99,39%
TCRBOA3-N	107.054.252	106.520.977	533.275	99,50%
TCRBOA3-T	95.754.360	95.299.939	454.421	99,53%
TCRBOA5-N	87.775.785	87.464.673	311.112	99,65%
TCRBOA5-T	88.840.426	88.582.372	258.054	99,71%

Fonte: Log de processamento do *software* BWA²⁶.

Legenda: TCRBOA = *Texas Cancer Research Biobank Open Access*.

Nota: O *software* BWA alinha os reads de 100 pares de bases ao genoma de referência GRCh38. Para cada amostra, são informados a quantidade de reads de 100 pares de base produzidos pelos sequenciadores *Illumina* (coluna quantidade total de reads), quantos desses reads o BWA conseguiu alinhar ao genoma de referência (coluna quantidade de reads alinhados), quantos ele não conseguiu alinhar (coluna quantidade de reads não alinhados) e o percentual de reads alinhados. Os índices de alinhamento são superiores a 99% para todas as amostras, o que indica uma boa qualidade. A denominação da amostra é composta pela identificação do paciente seguida da terminação T ou N, conforme seja a amostra de tecido tumoral, ou normal, respectivamente. Desse modo, TCRBOA1-T identifica a amostra tumoral do paciente TCRBOA1.

Tabela 3. Quantificação das variantes por amostra e tipo

Identificação do paciente	TCRBOA1		TCRBOA2		TCRBOA3		TCRBOA5		Total
	Normal	Tumoral	Normal	Tumoral	Normal	Tumoral	Normal	Tumoral	
Número de SNP	20.573	7.944	20.778	8.191	20.805	8.844	20.593	7.221	114.949
Número de INDEL	1.074	812	1.085	1.037	1.159	1.011	1.103	944	8.225
Total	21.647	8.756	21.863	9.228	21.964	9.855	21.696	8.165	123.174

Legendas: TCRBOA = *Texas Cancer Research Biobank Open Access*; SNP = base nitrogenada do genoma; INDEL = pequenas inserções ou deleções de algumas bases nitrogenadas no genoma.

Nota: Cada paciente teve duas amostras tumorais sequenciadas: uma do tecido tumoral (PDAC) e outra de tecido saudável (glóbulos brancos). Uma vez alinhadas ao genoma de referência GRCh38, o *software* GATK identificou, para cada uma delas, as variantes presentes nas amostras. A tabela quantifica para cada amostra as variantes do tipo SNP, no qual apenas uma base está alterada no genoma da amostra, e do tipo INDEL, no qual diversas bases foram nele removidas ou inseridas.

Entre as variantes SNP e INDEL somáticas encontradas, 69 são de alta qualidade e estão mostradas na Figura 1, agrupadas por paciente. O gene KRAS está mutado em dois dos quatro pacientes. Mutações do tipo *missense*, nas quais há alteração na proteína capaz ou não de afetar sua função, e tipo *nonsense*, nas quais a alteração da proteína causa uma provável perda de função, são as mais prevalentes. Ademais, entre as variantes somáticas, três são de alto impacto (causam perda da função da proteína: genes AOPEP, DMD e DSCAM) e cinco patogênicas (genes KRAS, TP53, DMD e CYP27A1)³⁵. A Figura 1 ilustra as variantes somáticas do tipo SNP e INDEL agrupadas por tumor, o que mostra de forma didática a diversidade e especificidade tumoral em nível molecular.

Das variantes estruturais (SV), identificou-se uma duplicação cromossômica na região 19q13.2, com aproximadamente 418 mil bases (Figura 2). Essa duplicação atingiu os genes MAP3K10, CNTD2, AKT2, C19orf47, PLD3, HIPK4, PRX, SERTAD1, BLVRB, SPTBN4³⁶.

Das variantes germinativas, tem-se 14 variantes patogênicas, sendo uma associada à pancreatite crônica (gene CFTR, variante rs113993960, deleção, paciente TCRBOA3); 93 variantes associadas a fatores de risco para doenças como: síndrome de Von-Hippel-Lindau (gene CCND1, variante rs9344, genótipo A/A, paciente TCRBOA2); e pancreatite hereditária (gene CTSC, variante rs121909239, genótipo C/T, paciente TCRBOA3)³⁵. Por fim, as variantes associadas à melhor resposta a medicamentos: para os compostos de platina, o paciente TCRBOA5 apresenta as variantes rs1042522, gene TP53, genótipo C/C (polimorfismo do códon 72) e variante rs25487, gene XRCC1, genótipo C/C³⁵.

A partir desses resultados, torna-se factível avaliar as possibilidades de terapia-alvo para os quatro pacientes,

conforme as características moleculares das células contidas nas amostras tumorais e normais.

DISCUSSÃO

Conforme a Tabela 1, os dados clínicos dos pacientes sugerem tumores semelhantes e, embora não haja informações sobre a aptidão dos pacientes para a quimioterapia, o protocolo estabelece abordagens análogas de terapêutica: cirurgia mais quimioterapia neoadjuvante e adjuvante com FOLFIRINOX⁶. Ocorre que, conforme os resultados obtidos a partir do WES, observa-se que, apesar de histologicamente similares, em nível molecular, os tumores dos quatro pacientes em análise são bem diversos, com importantes implicações na escolha do tratamento.

O PDAC do paciente TCRBOA3 apresenta duplicação do segmento 19q13.2, onde se localiza o gene AKT2. Esse oncogene pertence à via de sinalização do gene PI3K, associada ao crescimento, proliferação, sobrevivência e invasão celular, bem como resistência à quimioterapia e prognóstico reservado. Desse modo, é indicado avaliar o uso de terapias-alvo que inibam a via PI3K/AKT/mTOR³⁷. Ainda, esse paciente possui mutação do gene KRAS (variante rs121913529, genótipo C/T) que também promove proliferação e sobrevivência celular. Logo, terapias-alvo de inibição da via RAS³⁸ também estariam indicadas.

Em uma outra abordagem terapêutica, a presença da duplicação do segmento 19q13.2, somada ao elevado número de mutações somáticas, sugere tratar-se de um tumor com instabilidade estrutural, cuja resposta aos inibidores de PARP associados a quimioterápicos com platina é boa^{3,18}. Ademais, esse paciente possui dois polimorfismos associados à pancreatite crônica (genes CFTR, variante rs113993960 e CTSC, variante

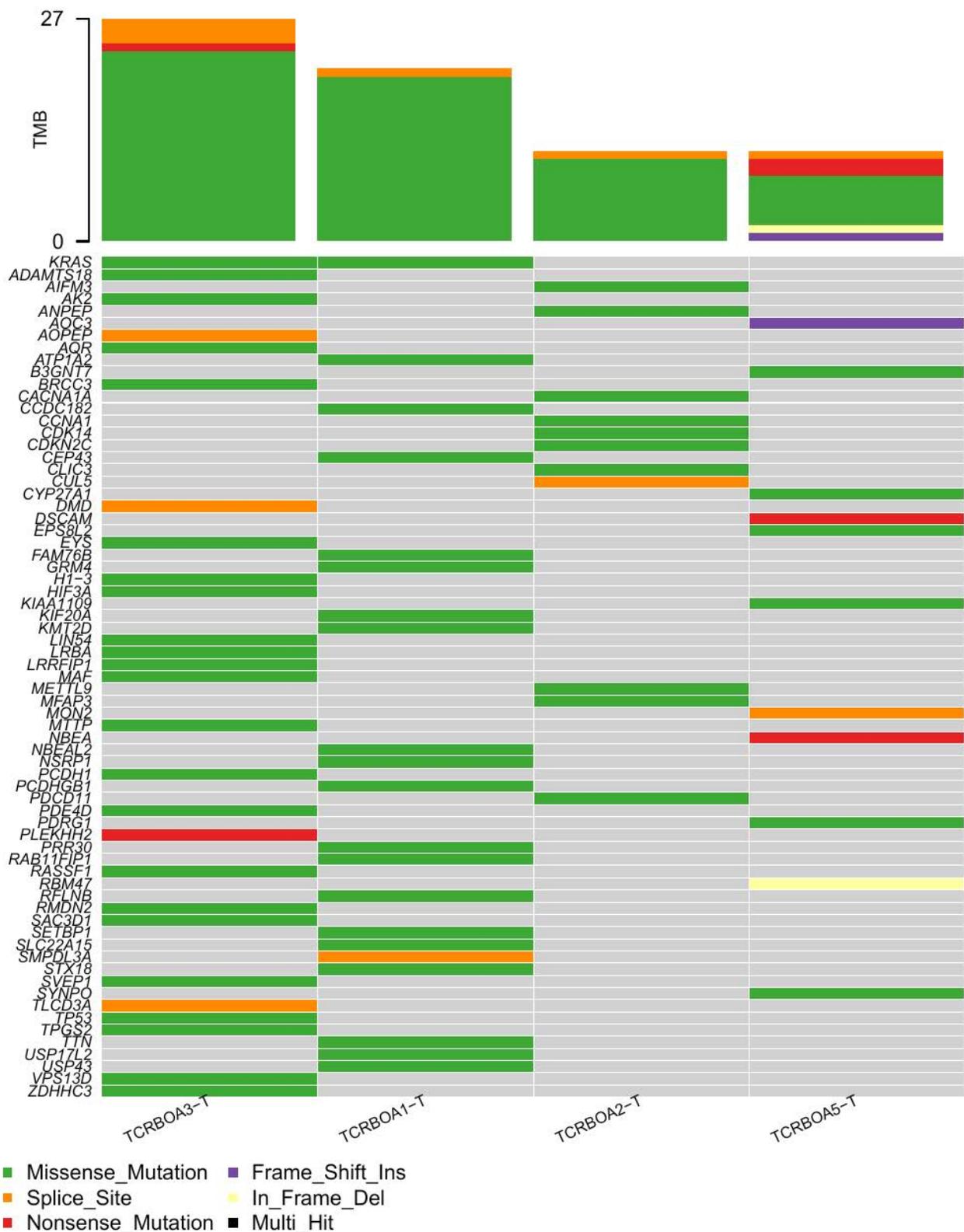


Figura 1. Variantes somáticas encontradas nas amostras de PDAC dos pacientes

Nota: A coluna à esquerda indica o nome do gene que apresenta mutações. Na linha, a identificação do paciente. A cor identifica o tipo de mutação: mutações do tipo missense, nas quais a mudança na base muda o códon do aminoácido, o que pode ou não prejudicar a função da proteína, e são as mais prevalentes. Nas mutações nonsense, a função da proteína é prejudicada pela mutação. A amostra TCRBOA5-T possui baixa celularidade tumoral, o que prejudica a análise.

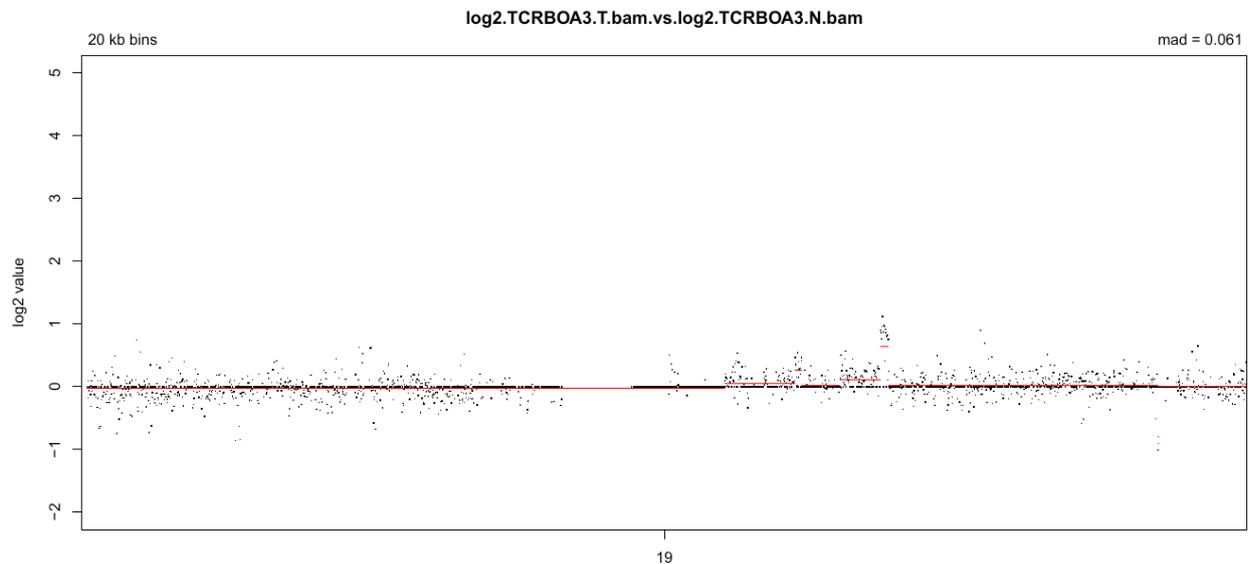


Figura 2. Alterações estruturais presentes no cromossomo 19 na amostra tumoral do paciente TCRBOA3

Nota: A região duplicada aparece como uma linha paralela horizontal. Essa região corresponde ao segmento 19q13.2 do cromossomo 19 e tem aproximadamente 418 mil bases. Entre os genes contidos nessa região está o AKT2, oncogene com evidência na literatura de associação com maior instabilidade cromossômica do tumor.

rs121909239)³⁵, o que indica o rastreo do PDAC nos seus ascendentes e descendentes.

Um quadro diverso se desenha para o paciente TCRBOA2. No seu tumor, a análise das variantes somáticas revela alterações nos genes associados à via das ciclinas/quinasas dependentes de ciclinas (CDK): CCNA1, CDK14 e CDKN2C, que controlam a progressão do ciclo celular e cujas mutações resultam em proliferação celular desregulada e na formação de células-tronco, ambos mecanismos associados a um processo oncogênico. Assim, há a possibilidade do uso de terapias-alvo que inibam a via das CDK³⁹ para impedir o crescimento tumoral. Esse fato, associado à pouca quantidade de mutações, e a ausência de alterações genômicas estruturais relevantes sugerem estabilidade genômica desse tumor, desaconselhando assim o uso de inibidores de PARP^{3,18}. Não menos importante é a variante germinativa associada à síndrome de Von-Hippel-Lindau (gene CCND1 variante rs9344)³⁵, o que também indica o rastreo do PDAC para os ascendentes e descendentes desse paciente.

Por sua vez, as variantes somáticas encontradas no tumor do TCRBOA5 não apresentaram nenhuma associação com aquelas documentadas como indutoras de PDAC. A razão disso pode ser a baixa celularidade tumoral presente na amostra sequenciada, de apenas 5%. Nessa análise, foram encontradas mutações do tipo *nonsense* nos genes NBEA e DSCAM, uma deleção no gene RBM47, genes KRAS e TP53 selvagens e ausência de alterações estruturais relevantes. Em relação às germinativas, esse paciente é portador de variantes associadas a uma melhor resposta a compostos de platina e melhor sobrevida (gene

TP53, variante rs1042522, C/C e gene XRCC1, variante rs25487, C/C)³⁵.

Por fim, o paciente TCRBOA1 apresentou mutações somáticas do tipo *missense*, entre elas a variante rs121913529, gene KRAS, genótipo T, cujo significado é patogênico e associado ao PDAC³⁵. KRAS é um oncogene e pacientes com mutações apresentam mau prognóstico e baixa resposta à quimioterapia. De modo análogo ao paciente TCRBOA3, terapias-alvo inibidoras de KRAS são indicadas para o tratamento desse tumor. Uma outra característica é a ausência de instabilidade estrutural no genoma, o que contraindica os inibidores de PARP ou a imunoterapia^{3,18}.

Um outro aspecto a ser analisado é que, a partir dos elementos vistos anteriormente, foi possível identificar características moleculares do tumor e do paciente que afetam o valor preditivo positivo do regime quimioterápico padrão. No paciente TCRBOA3, cujo AKT2 está duplicado, o uso do FOLFIRINOX sem inibir esse gene seria pouco eficaz; raciocínio análogo aplica-se ao paciente TCRBOA2, cuja via das CDK está permanentemente ativada.

Desse modo, para diminuir a morbimortalidade do PDAC, é necessário conhecê-lo em nível molecular, a fim de conformar a intervenção às características do tumor e do paciente. Para tanto, o WES mostra-se uma ferramenta adequada para alcançar esse objetivo.

CONCLUSÃO

O presente artigo apresentou todos os passos e as ferramentas necessários à execução da análise do exoma

para identificar as variantes somáticas, germinativas e alterações estruturais no genoma do PDAC. A metodologia aqui descrita pode ser usada em quaisquer outras neoplasias e, embora realizada *in silico*, não só chegou aos mesmos oncogenes indutores de tumores anteriormente identificados nos pacientes TCRBOA1, TCRBOA2, TCRBOA3 e TCRBOA5, como também identificou uma inédita duplicação na região 19q13.2, onde se localiza o oncogene AKT2, no tumor do paciente TCRBOA3.

Também mostrou que, apesar de o estadiamento classificar uniformemente todos os PDAC, cada paciente – bem como o respectivo tumor – apresenta especificidades moleculares que afetam o diagnóstico e o desfecho clínico. A técnica de WES permite identificar essas especificidades e ampliar as possibilidades terapêuticas a partir do conhecimento das variantes somáticas, germinativas e alterações estruturais do genoma dos tumores. E que, considerando o preço do WES (aproximadamente 300 dólares), a relação custo-benefício é adequada, pois permite identificar as variantes somáticas e germinativas em um único exame. É necessário, contudo, reconhecer que essa técnica exige a formação de laboratórios específicos e com pessoal altamente treinado, incluindo bioinformática.

Por fim, pelas razões já expostas, fica clara a necessidade de divulgar e ampliar o uso da análise do WES nos serviços oncológicos, bem como capacitar as equipes na sua realização e utilização.

CONTRIBUIÇÕES

Ambos os autores contribuíram substancialmente na concepção e/ou no planejamento do estudo; na obtenção, análise e interpretação dos dados; na redação e revisão crítica; e aprovaram a versão final a ser publicada.

DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSES

Nada a declarar.

FONTES DE FINANCIAMENTO

Não há.

REFERÊNCIAS

- Instituto Nacional de Câncer [Internet]. Rio de Janeiro: INCA; [data desconhecida]. Tipos de câncer: câncer de pâncreas; [atualizada 2021 ago 24; acesso 2022 jan 15]. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-pancreas>
- Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin.* 2020;70(1):7-30. doi: <https://doi.org/10.3322/caac.21590>
- Markham MJ, Wachter K, Agarwal N, et al. Clinical cancer advances 2020: annual report on progress against cancer from the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol.* 2020;38(10):1081. doi: <https://doi.org/10.1200/JCO.19.03141>. Erratum in: *J Clin Oncol.* 2020;38(26):3076. doi: <https://doi.org/10.1200/JCO.20.02291>
- Luchini C, Capelli P, Scarpa A. Pancreatic ductal adenocarcinoma and its variants. *Surg Pathol Clin.* 2016;9(4):547-60. doi: <https://doi.org/10.1016/j.path.2016.05.003>
- Porta M, Fabregat X, Malats N, et al. Exocrine pancreatic cancer: symptoms at presentation and their relation to tumour site and stage. *Clin Transl Oncol.* 2005;7(5):189-97. doi: <https://doi.org/10.1007/BF02712816>
- National Comprehensive Cancer Network. Pancreatic adenocarcinoma [Internet]. Version 2.2021. Plymouth Meeting, PA: NCCN; 2021 Feb 25. [cited 2021 Oct 7]. Available from: <https://www.nccn.org/guidelines/nccn-guidelines/guidelines-detail?category=1&cid=1455>
- Amin MB, Edge S, Greene F, et al, editors. *AJCC cancer staging manual.* 8th ed. Springer International Publishing: American Joint Commission on Cancer; 2017.
- Schmied BM, Z'graggen K, Redaelli CA, et al. Problems in staging of pancreatic and hepatobiliary tumours. *Ann Oncol.* 2000;11 Suppl 3:161-4. doi: https://doi.org/10.1093/annonc/11.suppl_3.161
- Kamarajah SK, Burns WR, Frankel TL, et al. Validation of the American Joint Commission on Cancer (AJCC) 8th edition staging system for patients with pancreatic adenocarcinoma: a Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) Analysis. *Ann Surg Oncol.* 2017;24(7):2023-30. doi: <https://doi.org/10.1245/s10434-017-5810-x>
- Cancer Genome Atlas Research Network, Weinstein JN, Collisson EA, et al. The Cancer Genome Atlas Pan-Cancer analysis project. *Nat Genet.* 2013;45(10):1113-20. doi: <https://doi.org/10.1038/ng.2764>
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144(5):646-74. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- McCombie WR, McPherson JD, Mardis ER. Next-generation sequencing technologies. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2019;9(11):a036798. doi: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a036798>
- van Dijk EL, Auger H, Jaszczyszyn Y, et al. Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends Genet.* 2014;30(9):418-26. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tig.2014.07.001>
- Ding L, Bailey MH, Porta-Pardo E, et al. Perspective on oncogenic processes at the end of the beginning of cancer genomics. *Cell.* 2018;173(2):305-20.e10. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.033>

15. Strom SP. Current practices and guidelines for clinical next-generation sequencing oncology testing. *Cancer Biol Med.* 2016;13(1):3-11. doi: <https://doi.org/10.28092/j.issn.2095-3941.2016.0004>
16. Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic characterization of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell.* 2017;32(2):185-203. e13. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.07.007>
17. Waddell N, Pajic M, Patch AM, et al. Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer. *Nature.* 2015;518(7540):495-501. doi: <https://doi.org/10.1038/nature14169>
18. Dreyer SB, Upstill-Goddard R, Paulus-Hock V, et al. Targeting DNA damage response and replication stress in pancreatic cancer. *Gastroenterology.* 2021;160(1):362-77. e13. doi: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.09.043>
19. Dreyer SB, Pinese M, Jamieson NB, et al. Precision oncology in surgery: patient selection for operable pancreatic cancer. *Ann Surg.* 2020;272(2):366-76. doi: <https://doi.org/10.1097/SLA.0000000000003143>
20. Ychou M, Conroy T, Seitz JF, et al. An open phase I study assessing the feasibility of the triple combination: oxaliplatin plus irinotecan plus leucovorin/ 5-fluorouracil every 2 weeks in patients with advanced solid tumors. *Ann Oncol.* 2003;14(3):481-9. doi: <https://doi.org/10.1093/annonc/mdg119>
21. Amstutz U, Henricks LM, Offer SM, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) guideline for dihydropyrimidine dehydrogenase genotype and fluoropyrimidine dosing: 2017 update. *Clin Pharmacol Ther.* 2018;103(2):210-6. doi: <https://doi.org/10.1002/cpt.911>
22. Swen JJ, Nijenhuis M, de Boer A, et al. Pharmacogenetics: from bench to byte--an update of guidelines. *Clin Pharmacol Ther.* 2011;89(5):662-73. doi: <https://doi.org/10.1038/clpt.2011.34>
23. Whirl-Carrillo M, McDonagh EM, Hebert JM, et al. Pharmacogenomics knowledge for personalized medicine. *Clin Pharmacol Ther.* 2012;92(4):414-7. doi: <https://doi.org/10.1038/clpt.2012.96>
24. PharmGKB [Internet]. Stanford (CA): Stanford, CA: Stanford University; c2001-2022. Clinical Annotation for UGT1A1*1, UGT1A1*28; FOLFIRI or irinotecan; Neutropenia (level 1A Toxicity); [cited 2022 Mar 13]. Available from: <https://www.pharmgkb.org/clinicalAnnotation/1451204660>
25. Becnel LB, Pereira S, Drummond JA, et al. An open access pilot freely sharing cancer genomic data from participants in Texas. *Sci Data.* 2016;3:160010. doi: <https://doi.org/10.1038/sdata.2016.10>
26. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics.* 2009;25(14):1754-60. doi: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp324>
27. FastQC [Internet]. Version 0.11.9. Cambridge: Babraham Institute. [2010]. – [cited 2022 Jan 3]. Available from: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
28. Benjamin D, Sato T, Cibulskis K, et al. Calling somatic SNVs and indels with Mutect2. *BioRxiv [Preprint].* 2019. doi: <https://doi.org/10.1101/861054>
29. Van der Auwera GA, Carneiro M, Hartl C, et al. From FastQ data to high confidence variant calls: the Genome Analysis Toolkit best practices pipeline. *Curr Protoc Bioinformatics.* 2013;43(1110):11.10.1-11.10.33. doi: <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi1110s43>
30. Kuilman T. CopywriteR: copy number information from targeted sequencing using off-target reads [Internet]. R package Version 2.26.0. [place unknown]: Bioconductor; c2003. doi: <https://doi.org/10.18129/B9.bioc.CopywriteR>
31. Danecek P, Bonfield JK, Liddle J, et al. Twelve years of SAMtools and BCFtools. *Gigascience.* 2021;10(2):giab008. doi: <https://doi.org/10.1093/gigascience/giab008>
32. McLaren W, Gil L, Hunt SE, et al. The ensembl variant effect predictor. *Genome Biol.* 2016;17(1):122. doi: <https://doi.org/10.1186/s13059-016-0974-4>
33. Conselho Nacional de Saúde (BR). Resolução nº 466, de 12 de dezembro de 2012. Aprova as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos [Internet]. *Diário Oficial da União, Brasília, DF.* 2013 jun 13 [acesso 2022 mar 20]; Seção 1:59. Disponível em: https://bvsm.sau.gov.br/bvs/sau/legis/cns/2013/res0466_12_12_2012.html
34. Conselho Nacional de Saúde (BR). Resolução nº 510, de 7 de abril de 2016. Dispõe sobre as normas aplicáveis a pesquisas em Ciências Humanas e Sociais cujos procedimentos metodológicos envolvam a utilização de dados diretamente obtidos com os participantes ou de informações identificáveis ou que possam acarretar riscos maiores do que os existentes na vida cotidiana, na forma definida nesta Resolução [Internet]. *Diário Oficial da União, Brasília, DF.* 2016 maio 24 [acesso 2022 mar 20]; Seção 1:44. Disponível em: http://bvsm.sau.gov.br/bvs/sau/legis/cns/2016/res0510_07_04_2016.html
35. Landrum MJ, Lee JM, Benson M, et al. ClinVar: improving access to variant interpretations and supporting evidence. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(D1):D1062-7. doi: <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1153>
36. Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, et al. GenBank. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(D1):D67-72. doi: <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1276>
37. Mehra S, Deshpande N, Nagathihalli N. Targeting PI3K pathway in pancreatic ductal adenocarcinoma: rationale and progress. *Cancers (Basel).* 2021;13(17):4434. doi: <https://doi.org/10.3390/cancers13174434>

38. Liu J, Kang R, Tang D. The KRAS-G12C inhibitor: activity and resistance. *Cancer Gene Ther.* 2021;29(7):875-878. doi: <https://doi.org/10.1038/s41417-021-00383-9>
39. Wijnen R, Pecoraro C, Carbone D, et al. Cyclin Dependent Kinase-1 (CDK-1) Inhibition as a Novel Therapeutic Strategy against Pancreatic Ductal Adenocarcinoma (PDAC). *Cancers (Basel).* 2021;13(17):4389. doi: <https://doi.org/10.3390/cancers13174389>

Recebido em 24/7/2022

Aprovado em 5/10/2022