

Eduardo Ramos Martins Cabral

**AVALIAÇÃO MUTACIONAL DOS TUMORES DE CÉLULAS GERMINATIVAS DE TESTÍCULO E
CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE SUAS LINHAGENS RESISTENTES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação Pio XII – Hospital de Amor de Barretos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Flavio Mavignier Cárcano

Coorientadora: Dra. Mariana Tomazini Pinto

Eduardo Ramos Martins Cabral

**AVALIAÇÃO MUTACIONAL DOS TUMORES DE CÉLULAS GERMINATIVAS DE TESTÍCULO E
CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE SUAS LINHAGENS RESISTENTES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação Pio XII – Hospital de Amor de Barretos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Flavio Mavignier Cárcano

Coorientadora: Dra. Mariana Tomazini Pinto

C117a Cabral, Eduardo Ramos Martins.

Avaliação mutacional dos tumores de células germinativas de testículo e caracterização genética de suas linhagens resistentes. / Eduardo Ramos Martins Cabral. - Barretos, SP - 2021.

89 f. : il.

Orientador: Flavio Mavignier Cárcano.
Coorientadora: Mariana Tomazini Pinto.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos, 2021.

1. TCGTs. 2. Proteína KRAS. 3. Resistência à cisplatina. 4. Casos refratários. 5. JEG3. 6. Perfil mutacional. Autor. II. Título.

CDD 616.994

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada por Martins Fideles dos Santos Neto CRB 8/9570
Biblioteca da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos

FOLHA DE APROVAÇÃO

Eduardo Ramos Martins Cabral

Avaliação mutacional dos tumores de células germinativas de testículo e caracterização genética de suas linhagens resistentes

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação PIO XII - Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde - Área de Concentração: Oncologia

Data da aprovação: 02 /08 / 2021

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Alexandre Andrade dos Anjos Jácome

Instituição: Oncoclínicas - OncoBio Comprehensive Cancer Center

Prof. Dra. Mariana Bisarro dos Reis

Instituição: Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos

Prof. Dr. Flavio Mavignier Cárcano

Orientador

Prof. Dra. Mariana Tomazini Pinto

Coorientadora

Prof. Dra. Leticia Ferro Leal

Presidente da Banca Examinadora

Esta dissertação foi elaborada e está apresentada de acordo com as normas da Pós-Graduação do Hospital de Câncer de Barretos – Fundação Pio XII, baseando-se no Regimento do Programa de Pós-Graduação em Oncologia e no Manual de Apresentação de Dissertações e Teses do Hospital de Câncer de Barretos. Os pesquisadores declaram ainda que este trabalho foi realizado em concordância com o Código de Boas Práticas Científicas (FAPESP), não havendo nada em seu conteúdo que possa ser considerado como plágio, fabricação ou falsificação de dados. As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos.

Embora o Núcleo de Apoio ao Pesquisador do Hospital de Câncer de Barretos tenha realizado as análises estatísticas e orientado sua interpretação, a descrição da metodologia estatística, a apresentação dos resultados e suas conclusões são de inteira responsabilidade dos pesquisadores envolvidos.

Os pesquisadores declaram não ter qualquer conflito de interesse relacionado a este estudo.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, que foi minha fortaleza nos momentos de fraqueza e desespero. Por ter me mostrado o caminho e me sustentado, nos momentos em que eu me vi perdido e pensava em desistir. Àquele que, mesmo em silêncio, me amparava e me protegia dos meus maiores medos.

Aos meus pais Célio e Rosa Maria, pelo apoio, força e cuidados de sempre. Mais um mérito! Mais uma conquista! Mais um título! E tudo isso devo a vocês, que sempre me incentivaram a não parar. Obrigado por tudo! Amo vocês!

Ao meu irmão Paulo Henrique e à minha cunhada Camila, nos quais eu também me espelho para seguir meu caminho; vocês são exemplos de dedicação para mim. E obrigado por trazerem mais alegria à minha vida, com nossa pequena Sophia.

Ao meu orientador, Dr. Flávio Cárcano, e à minha coorientadora, Dra. Mariana Tomazini, obrigado pela dedicação, incentivo, confiança e paciência que teve comigo ao longo desses dois anos.

Aos meus assessores das bancas de acompanhamento, Dra. Letícia Ferro e Dr. Alexandre Jácome, pelas contribuições que deram ao nosso trabalho. Foram momentos de discussões valiosos, que tivemos ao longo dos dois anos.

À Dra. Mariana Bisarro, pelos treinamentos de protocolo, pela disponibilidade e por aceitar o convite de participar da banca de avaliação deste trabalho. A dedicação que você tem à pesquisa, é motivo da grande admiração.

Ao Dr. Rui Reis pelo grande apoio científico e por ser grande incentivador na pesquisa.

Aos meus amigos que estavam sempre disponíveis e abertos a me ajudar na realização dos experimentos e análises, Aline Larissa, Ícaro Alves, Carol Laus, Izabela Faria, André Lengert e Letícia Braga. O meu mais sincero obrigado!

Aos meus amigos que sempre me incentivaram a seguir mesmo diante das dificuldades, Giovanna Stanfoca, Marcela Nunes, Renato José, Karina Mello, Patrick Vital, Murilo Bonatelli, Kericy Fram, Leonardo Barato, Gustavo Borges e Dennys Araújo.

À Pós Graduação do Hospital de Amor de Barretos, pela atenção e colaboração ao longo do mestrado.

Ao grupo de pesquisa de Oncologia Genitourinária (OncoGU) e ao Grupo de Pesquisa em Oncologia Pediátrica (GPOPed) por compartilharem tantos momentos de discussões que foram de fundamental importância para nosso trabalho.

Aos colegas Marília Pacanhella, Daniel Preto e Tulio, pelo auxílio com a parte clínica e nas revisões de prontuários dos casos do nosso estudo.

Ao Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular (CPOM); ao setor de Diagnóstico Molecular nas pessoas de Dra. Flavia Escremim, Dr. Gustavo Noriz e Dr. André Escremim; ao setor de Patologia, na pessoa de Dr. Eduardo Caetano; ao Núcleo de Epidemiologia e Bioestística (NEB), na pessoa de Marcos Alves; e ao setor de Registro Hospitalar, na pessoa de Raiany Carvalho.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram com o desenvolvimento deste trabalho e com o profissional que me tornei, muito obrigado!

EPÍGRAFE

“A ciência não é uma ilusão, mas seria uma ilusão acreditar que poderemos encontrar noutra lugar, o que ela não nos pode dar”

Sigmund Freud

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Aspectos epidemiológicos	1
1.2	Fatores de risco para o desenvolvimento dos TCGTs	2
1.3	Histogênese e histopatologia dos TCGTs	3
1.4	Estratificação do risco dos TCGTs	5
1.5	Aspectos terapêuticos e a resistência à cisplatina	7
1.6	Aspectos moleculares	7
1.7	RAS/ <i>KRAS</i>	8
2	JUSTIFICATIVA	10
3	OBJETIVOS	11
3.1	Objetivo geral	11
3.2	Objetivos específicos	11
4	MATERIAIS E MÉTODOS	12
4.1	Delineamento do estudo	12
4.2	População de estudo	12
4.3	Coleta de dados clínicos	14
4.4	Recuperação das amostras biológicas	14
4.4.1	Amostras de tecido FFPE	14
4.4.2	Amostras de tecido fresco congelado	15
4.5	Linhagens celulares de TCGT	16
4.6	Estabelecimento do fenótipo de resistência	16
4.7	Extração do DNA	19
4.8	Análise de CNV do gene <i>KRAS</i> por qPCR	20
4.9	Análise de mutações por NGS	21
4.9.1	Avaliação da qualidade e integridade do DNA extraído de tecido FFPE	21
4.9.2	Preparo de bibliotecas e sequenciamento NGS	21
4.9.3	Alinhamento e chamada de variantes	23
4.9.4	Anotação das variantes	24
4.10	Variáveis do estudo	24
4.11	Análise estatística	25

5	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	26
6	RESULTADOS	27
6.1	Caracterização da amostra	27
6.2	Estabelecimento do modelo <i>in vitro</i> de resistência à cisplatina	29
6.3	Análise de CNV para <i>KRAS</i>	29
6.4	Distribuição das variantes chamadas	32
7	DISCUSSÃO	54
9	CONCLUSÃO	60

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Estimativa da prevalência dos tumores malignos mais comuns entre homens com idades entre 15 e 44 anos em todo o mundo, em 2018.	1
Figura 2 –	Representação esquemática dos tipos de TCGT.	5
Figura 3 –	Fluxograma da estratégia experimental do projeto.	12
Figura 4 –	Fluxograma da população incluída no estudo.	13
Figura 5 –	Fluxograma de casos factíveis para análise de mutações por sequenciamento NGS.	15
Figura 6 –	Fluxograma de casos factíveis para análise de CNV por qPCR.	16
Figura 7 –	Estabelecimento do fenótipo de resistência. a) Distribuição das células em frascos de cultura T25 e tratamento da linhagem JEG3 parental (JEG3-P) com as doses 0,087 μ M (IC_{10}), 0,528 μ M (IC_{25}) e 3,024 μ M (IC_{50}), para avaliar a melhor concentração a partir da qual os tratamentos se iniciariam. b) Estratégia de tratamentos da linhagem JEG3 com a droga cisplatina para estabelecimento da linhagem resistente.	18
Figura 8 –	Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida global de pacientes com TCGT. O tempo de sobrevivência é apresentado em anos.	28
Figura 9 –	Resposta das linhagens JEG3 parental (JEG3-P) e JEG3 resistente (JEG3-R) o tratamento com cisplatina, verificada pelo ensaio de viabilidade celular. a) Viabilidade celular das linhagens JEG3 parental e resistente em função do log da concentração de cisplatina. b) Determinação do IC_{50} das linhagens JEG3 parental e resistente.	29
Figura 10 –	Variação do número de cópias do gene <i>KRAS</i> e dados clínico-patológicos.	30
Figura 11 –	Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida global de pacientes com TCGT de acordo com estadiamento amplificação do gene <i>KRAS</i> . O tempo de sobrevivência é apresentado em anos; e os valores de p estão relacionados aos resultados do teste Log-rank.	32

Figura 12 –	Número de variantes chamadas em cada um dos 12 genes mutados.	33
Figura 13 –	Frequência de variantes conhecidas e preditas como <i>driver</i> nos 10 genes mutados.	34
Figura 14 –	Distribuição das variantes conhecidas e preditas como <i>driver</i> , por pacientes.	35
Figura 15 –	Gráfico <i>lollipop</i> das variantes encontradas no gene <i>ERBB2</i> .	36
Figura 16 –	Gráfico <i>lollipop</i> das variantes encontradas no gene <i>NRAS</i> .	37
Figura 17 –	Gráfico <i>lollipop</i> das variantes encontradas no gene <i>PIK3CA</i> .	38
Figura 18 –	Gráfico <i>lollipop</i> das variantes encontradas no gene <i>KRAS</i> .	39
Figura 19 –	Gráfico <i>lollipop</i> das variantes encontradas no gene <i>PDGFRA</i> .	40
Figura 20 –	Gráfico <i>lollipop</i> das variantes encontradas no gene <i>BRAF</i> .	41
Figura 21 –	Gráfico <i>lollipop</i> das variantes encontradas no gene <i>EGFR</i> .	42
Figura 22 –	Gráfico <i>lollipop</i> das variantes encontradas no gene <i>KIT</i> .	43
Figura 23 –	Gráfico <i>lollipop</i> das variantes encontradas no gene <i>TP53</i> .	45
Figura 24 –	Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida global de pacientes com TCGT de acordo com estadiamento AJCC, grupo histológico, risco IGCCCG e status de quimiossensibilidade. O tempo de sobrevivência é apresentado em anos; e os valores de p estão relacionados aos resultados do teste Log-rank.	51
Figura 25 –	Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida global de pacientes com TCGT para cada gene mutado. O tempo de sobrevivência é apresentado em anos; e os valores de p estão relacionados aos resultados do teste Log-rank.	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Os três tipos de Tumores de Células Germinativas do Testículo (TCGTs).	4
Tabela 2	Classificação prognóstica IGCCCG (doença avançada – estágios II e III).	6
Tabela 3	Sequência dos primers para PCR Multiplex do gene GAPDH e tamanho dos fragmentos gerados.	21
Tabela 4	Éxons cobertos pelo painel Trusight Tumor 15.	22
Tabela 5	Características dos pacientes com TCGT do Hospital de Amor de Barretos.	27
Tabela 6	Características clínico-patológicas dos pacientes com TCGT e resultados da variação no número de cópias do gene <i>KRAS</i> .	31
Tabela 7	Variantes identificadas no gene <i>ERBB2</i> .	36
Tabela 8	Variantes identificadas no gene <i>NRAS</i> .	37
Tabela 9	Variantes identificadas no gene <i>PIK3CA</i> .	38
Tabela 10	Variantes identificadas no gene <i>KRAS</i> .	39
Tabela 11	Variantes identificadas no gene <i>PDGFRA</i> .	40
Tabela 12	Variantes identificadas no gene <i>BRAF</i> .	41
Tabela 13	Variantes identificadas no gene <i>EGFR</i> .	42
Tabela 14	Variantes identificadas no gene <i>KIT</i> .	43
Tabela 15	Variantes identificadas no gene <i>TP53</i> .	44
Tabela 16	Análise univariada da associação entre características clínico-patológicas e variantes de interesse.	46
Tabela 17	Análise de associação entre sobrevida global de pacientes com TCGT e o status de mutação de cada gene.	52

LISTA DE ABREVIATURAS

AFP	Alfa-fetoproteína
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CNV	Variação no Número de Cópias
ECACC	<i>European Collection of Cell Cultures</i>
FFPE	Fixado em Formalina e Embebido em Parafina
GCNIS	Neoplasias de Células Germinativas <i>in situ</i>
HA	Hospital de Amor
hCG	Gonadotrofina Coriônica humana
IGCCCG	<i>International Germ Cell Cancer Collaborative Group</i>
LDH	Lactato Desidrogenase
OMS	Organização Mundial de Saúde
SAME	Serviço de Arquivo Médico e Estatística
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
APC	<i>Annual Percentage Change</i>
TCGs	Tumores de Células Germinativas
TCGTs	Tumores de Células Germinativas do Testículo
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TNM	Tumor – Nódulo – Metástase

RESUMO

JUSTIFICATIVA: Os Tumores de Células Germinativas do Testículo (TCGTs) são tumores relativamente raros na população em geral, correspondem a cerca de 1,7% de todos os tipos de câncer; no entanto, são os tumores malignos mais comuns entre homens com idades entre 15 e 44 anos em todo o mundo. A insurgência da doença refratária nos impulsiona a realizar uma avaliação mutacional deste tipo de tumor em uma série de casos brasileiros, uma vez que possa haver diferenças e particularidades em relação a populações já estudadas, majoritariamente europeias; bem como uma melhor caracterização molecular e genética desta entidade em linhagens celulares, dado que o estudo em modelos de resistência estabelecidos *in vitro* podem servir futuramente como modelo clínico para a avaliação de novas estratégias terapêuticas. A compreensão molecular desta doença pode conduzir a assinaturas que delinearão o tratamento para uma ação mais específica e efetiva, além da possibilidade de agregar informação prognóstica mais sensível. **OBJETIVOS:** Avaliar a possível associação de alterações moleculares nos TCGTs com as características clínico-patológicas e desfechos clínicos dos pacientes que sofrem desta enfermidade. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Uma coorte de 97 pacientes com TCGT, do Hospital de Amor de Barretos, foi avaliada através de dados clínicos e moleculares de acordo com os objetivos do estudo. Um modelo de resistência foi criado a partir de uma linhagem celular de TCG (JEG3). Por meio da PCR em tempo real avaliou-se a variação do número de cópias do gene *KRAS* para 51 casos, e um painel de 15 genes foi analisado por Sequenciamento de Nova Geração para 65 pacientes e 2 linhagens celulares de TCGT. A descrição da amostra foi feita através de medidas de frequência, tendência e dispersão. Análise univariada foi utilizada para comparar categorias da amostra em relação às frequências de mutações. Curvas de sobrevida foram plotadas por meio do método de Kaplan-Meier. Comparações univariadas de tempos de sobrevida foram realizadas através do teste de *log rank*. **RESULTADOS:** A probabilidade de sobrevida global da coorte analisada foi de 83,2% no período de seguimento de 10 anos. O modelo de resistência da linhagem JEG3 apresentou um IC_{50} cerca de 8 vezes maior, em relação à linhagem parental. Em 51 casos analisados para a variação do número de cópias, 80,4% dos casos apresentaram ganho de cópias do gene *KRAS*. Na análise univariada, não foi observada uma relação clara entre os grupos e os casos com variação no número de cópias de *KRAS*. Observou-se uma redução da sobrevida global dos casos com aumento do número de cópias do gene *KRAS*. Em 65 casos

foram factíveis de análise para presença de variantes, observou-se que 40% dos casos apresentaram pelo menos uma variante conhecida e/ou predita como *driver* em um dos 15 genes testados, sendo o *TP53* o gene mais comumente mutado. Nenhuma variante conhecida ou predita como *driver* foi identificada nas linhagens NTERA-2R e JEG3R. Os pacientes diagnosticados com TCGT em estadio III apresentaram uma sobrevida global mais baixa, quando comparado aos casos em estadio IS, I e II. Uma tendência de pior sobrevida global para os casos de não seminoma e risco intermediário e pobre; e os casos resistentes à cisplatina apresentaram uma sobrevida global de 33,3% no período de seguimento de 5 anos.

CONCLUSÃO: O aumento do número de cópias do gene *KRAS* não foi associado significativamente com nenhum dos dados clínico-patológicos, embora os não seminomas tenham apresentado uma maior taxa de amplificação no número de cópias deste gene. Ainda que mutações pontuais sejam eventos raros em TCGTs, variantes relevantes foram identificadas principalmente em *TP53*, *KIT*, *KRAS* e *NRAS*. A perspectiva de usar essas informações para a tomada de decisão na prática clínica, deve estimular a realização mais estudos que evidenciem a frequência de mutações específicas no TGCT.

PALAVRAS-CHAVES: TCGTs, proteína *KRAS*, resistência à cisplatina, casos refratários, JEG3, perfil mutacional.

ABSTRACT

BACKGROUND: Testicular Germ Cell Tumors (TGCTs) are relatively rare tumors in the general population, accounting for about 1.7% of all types of cancer; however, they are the most common malignant tumors among men aged 15 to 44 years worldwide. The outbreak of refractory disease drives us to carry out a mutational assessment of this type of tumor in a series of Brazilian cases, as there may be differences and particularities in relation to populations already studied, mostly European; as well as a better molecular and genetic characterization of this entity in cell lines, given that the study in established in vitro resistance models may serve in the future as a clinical model for the evaluation of new therapeutic strategies. The molecular understanding of this disease can lead to signatures that will delineate the treatment for a more specific and effective action, in addition to the possibility of adding more sensitive prognostic information. **AIMS:** To evaluate the possible association of molecular alterations in TCGTs with clinicopathological characteristics and clinical outcomes of patients suffering from this disease. **MATERIALS AND METHODS:** A cohort of 97 patients with TCGT, from the Barretos Cancer Hospital, was evaluated using clinical and molecular data according to the study objectives. A resistance model was created from a TCG cell line (JEG3). Real-time PCR was used to assess the variation in the number of copies of the KRAS gene for 51 cases, and a panel of 15 genes was analyzed by Next Generation Sequencing for 65 patients and 2 TCGT cell lines. The description of the sample was made through measures of frequency, trend and dispersion. Univariate analysis was used to compare sample categories in relation to mutation frequencies. Survival curves were plotted using the Kaplan- Meier method. Univariate comparisons of survival times were performed using the log rank test. **RESULTS:** The overall survival probability of the analyzed cohort was 83.2% in the 10-year follow-up period. The resistance model of the JEG3 line presented an IC50 about 8 times higher, compared to the parental line. In 51 cases analyzed for copy number variation, 80.4% of cases showed gain in copies of the KRAS gene. In univariate analysis, no clear relationship was observed between groups and cases with variation in KRAS copy number. There was a reduction in overall survival of cases with an increase in the number of copies of the KRAS gene. In 65 cases, mutation analysis was feasible, it was observed that 40% of the cases had at least one known and/or predicted variant as a driver in one of the 15 genes tested, with TP53 being the most commonly mutated gene. No known or predicted driver mutations were

identified in NTERA-2R and JEG3R strains. Patients diagnosed with stage III TCGT had a lower overall survival when compared to cases in stage IS, I and II. A trend of worse overall survival for cases of non-seminoma and intermediate and poor risk; and cisplatin-resistant cases had an overall survival of 33.3% in the 5-year follow-up period. **CONCLUSION:** The increase in the number of copies of the KRAS gene was not significantly associated with any of the clinicopathological data, although non-seminomas had a higher rate of amplification in the number of copies of this gene. Although point mutations are rare events in TCGTs, relevant variants have been identified mainly in TP53, KIT, KRAS and NRAS. The perspective of using this information for decision-making in clinical practice should encourage further studies that show the frequency of specific mutations in the TGCT.

KEYWORDS: TGCTs, *KRAS* protein, cisplatin resistance, refractory cases, JEG3, mutational profile.

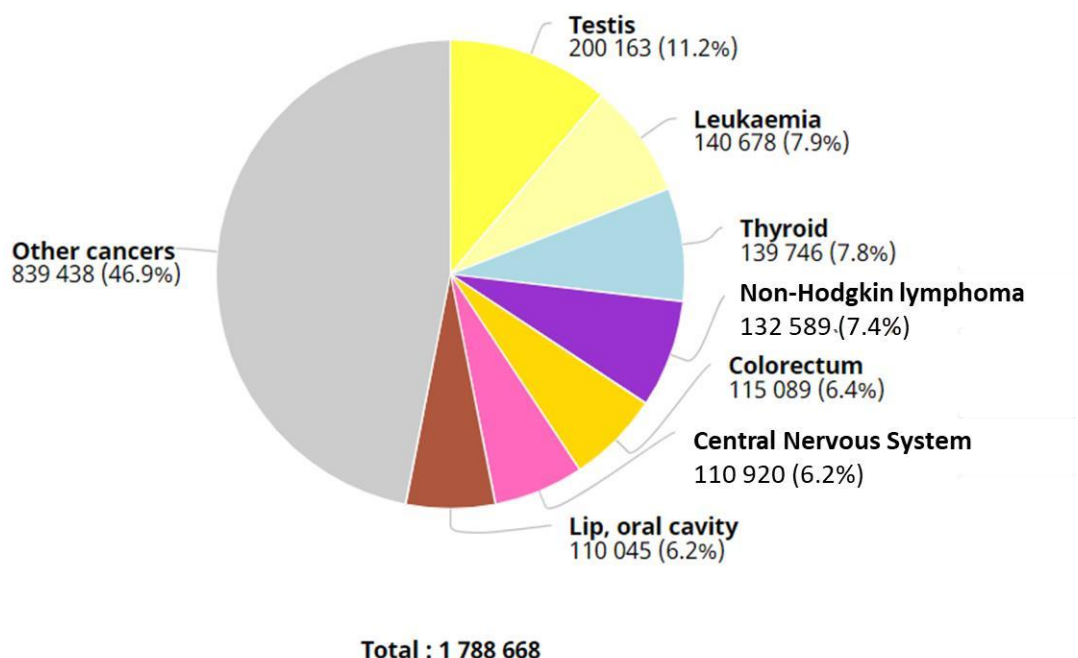
1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos epidemiológicos

Os Tumores de Células Germinativas (TCGs) correspondem a um grupo de neoplasias benignas ou malignas, provenientes de células germinativas primordiais pluripotentes do embrião humano¹. Os TCGs representam mais de 95% das neoplasias testiculares; e acometem com menor frequência, os ovários e regiões extragonadais ao longo da linha média do corpo (mediastino, retroperitônio, glândula pineal, área sacral), evento relacionado à embriogênese^{2,3}.

Os Tumores de Células Germinativas do Testículo (TCGTs) são tumores relativamente raros na população em geral, correspondem a cerca de 1,7% de todos os tipos de câncer⁴; no entanto, são os tumores malignos mais comuns entre homens com idades entre 15 e 44 anos em todo o mundo (Figura 1).

Estimated number of prevalent cases (5-year) in 2020, worldwide, males, ages 15-44



Fonte: GLOBOCAN 2020⁴.

Figura 1 – Estimativa da prevalência dos tumores malignos mais comuns entre homens com idades entre 15 e 44 anos em todo o mundo, em 2018.

Nos Estados Unidos (EUA) e em muitos países do norte e Leste Europeu, as taxas de incidência de TCGT aumentaram entre os anos de 1999 a 2012, principalmente entre os povos brancos não-hispânicos, seguidos por hispânicos, asiáticos e negros não-hispânicos^{5,6}. As projeções para 2026 mostram que as taxas de incidência de TCGT nos povos hispânicos serão maiores que qualquer outro grupo racial nos EUA e Europa; e embora as razões para esse aumento não tenham sido esclarecidas, os fatores de risco para o TCGT como causa desse aumento não podem ser descartada⁶.

No Brasil, observou-se uma estabilização da incidência da doença nos últimos 10 anos (APC 2,9%), embora as taxas de mortalidade tenham apresentado um aumento significativo (APC +1,8%) neste mesmo período⁷; indicando que os TCGTs estão entre as principais causas de morte, por câncer, em adultos jovens, segundo os últimos dados divulgados pela *International Agency for Research on Cancer (IARC)*⁸. As previsões apontam um aumento de 26,6% na taxa de mortalidade por TCGT no Brasil, no período de 2026–2030 em comparação com 2011–2015, principalmente nas regiões Sul, Norte e Nordeste, devido a mudanças na estrutura demográfica e o aumento do risco de morte no país⁹.

Considerando a estratificação de risco proposta pelo *International Germ Cell Cancer Collaborative Group (IGCCCG)* para esse tipo de tumor, uma sobrevida global de cinco anos é observada em 99% dos casos classificados como de baixo risco; ao passo que essa taxa diminui para 80% e 48%, para os casos intermediário e alto, respectivamente¹⁰. No Hospital de Amor (HA) de Barretos, a sobrevida global de cinco anos é alcançada por cerca de 85% dos pacientes acometidos pela doença, segundo dados do registro hospitalar¹¹.

1.2 Fatores de risco para o desenvolvimento dos TCGTs

Fatores de risco relevantes estão associados ao desenvolvimento dos TCGTs, como a história de um testículo não descido (criptorquidia), visto que homens com criptorquidia têm 4 a 6 vezes mais chances de serem diagnosticados com câncer testicular¹². Homens com TCGT unilateral apresentam um risco 12 a 30 vezes maior de desenvolver um tumor no testículo contralateral e 5-6% destes pacientes irão conter células precursoras da doença, no testículo oposto^{13,14}.

A história familiar de câncer de testículo também é um fator de risco que contribui significativamente para o desenvolvimento de TCGT, uma vez que as chances de desenvolver a doença aumentam em até 4 vezes para filhos e 10 vezes para irmãos de homens acometidos

com esse tipo de tumor¹⁵⁻¹⁹. O TCGT também está fortemente associado a infertilidade, de modo que homens inférteis podem apresentar um risco 52% maior de desenvolver câncer testicular, quando comparados a homens férteis²⁰⁻²⁵.

Evidências mostram que a raça e a exposição a fatores ambientais também estão associadas ao desenvolvimento de TCGT. Nos EUA, a incidência de TCGT é cerca de 5 vezes maior em brancos que em negros²⁶; no entanto, as razões para essa diferença são ainda desconhecidas. Estudos epidemiológicos mostraram que a exposição pré e pós-natal à substâncias químicas de desregulação endócrina, bem como à toxinas como organoclorados, bifenilos policlorados, cloreto de polivinila, ftalatos, maconha e tabaco, também podem contribuir com o desenvolvimento e progressão do TCGT²⁷⁻²⁹.

1.3 Histogênese e histopatologia dos TCGTs

Os TCGs se originam da diferenciação maligna de uma célula germinativa pluripotente do embrião humano que, em condições normais de desenvolvimento, se diferencia em espermatogônia e oócito, no epitélio seminífero dos testículos e nos ovários, respectivamente³⁰. Estas células germinativas, provenientes das primeiras divisões celulares, migram desde o saco vitelino à crista genital por toda a extensão da linha média, em virtude da sinalização das vias *KIT* e *CXCL12-CXCR4*, e ganham a denominação de gonócitos³¹.

Acredita-se que mutações no processo de maturação e diferenciação celular dos gonócitos, associados ao microambiente em que se encontram, levam à formação das neoplasias de células germinativas *in situ* (GCNIS) na membrana basal dos túbulos seminíferos^{32,33}. As GCNIS, como células precursoras resultantes do desenvolvimento embrionário anômalo, podem seguir por um período de dormência até a puberdade e, sob efeito de hormônios sexuais e mudanças genéticas adicionais, findar sua transformação maligna, levando ao surgimento dos TCGTs³².

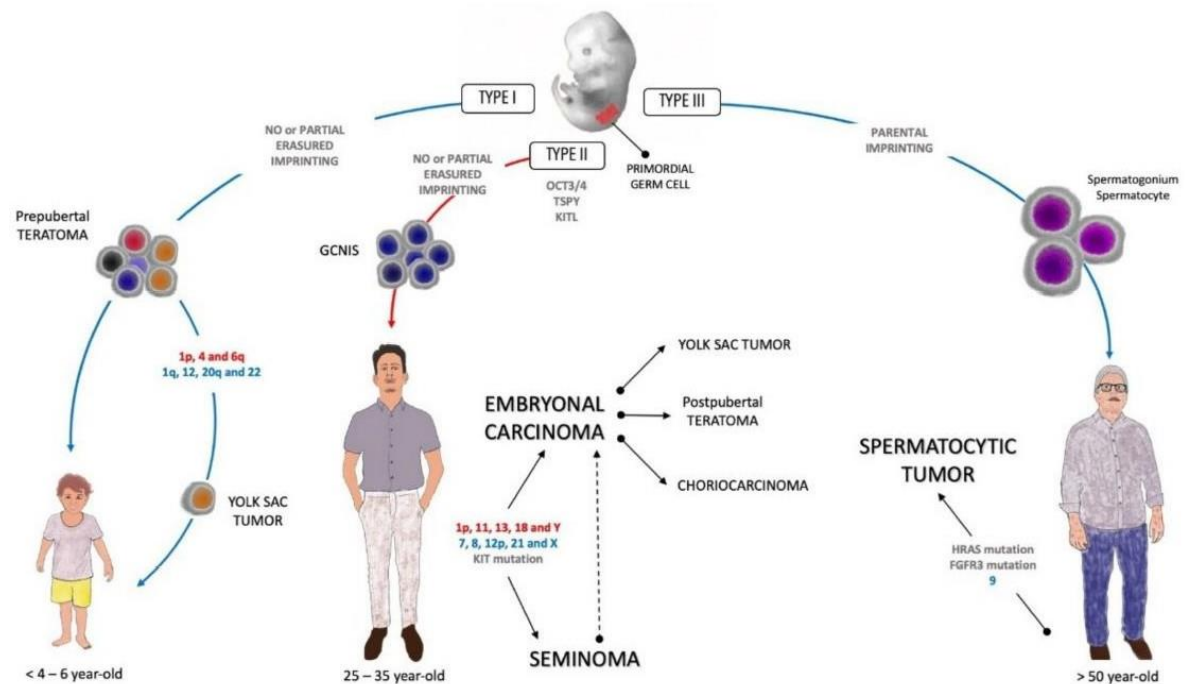
A Organização Mundial de Saúde (OMS) reconheceu, em 2016, um sistema de classificação dos TCGTs (Tabela 1), no qual compreendem três das cinco entidades de TCGs, de acordo com o tipo celular envolvido, a presença de linhagens embrionárias e extraembrionárias, a composição histológica do tumor, dentre outras características genéticas³⁴.

Tabela 1 – Os três tipos de Tumores de Células Germinativas do Testículo (TCGTs).

Tipo	Sítio Anatômico	Fenótipo	Idade	Célula de origem	Genótipo
I	Testículos Ovários Região Sacral	Teratoma Imaturo	Neonatos e Crianças	Célula Germinativa Primordial / Gonócitos	Diploide (teratoma) Aneuploide (Tumor do Seio Endodérmico): ganho de 1q, 12(p13) e 20q e perda de 1p, 4 e 6q.
	Retroperitônio Pesçoço Cérebro médio Outros sítios raros	Tumor do Seio Endodérmico			
II	Testículos	Seminomas Não-seminomas	> 15 anos (idade média 35 e 25anos) > 4 anos	Célula Germinativa Primordial / Gonócitos	Aneuploide (ganho de X, 7, 8, 12p, e 21. Perda de Y, 1p, 11, 13 e 18. Aneuploide
	Ovários	Disgerminomas Não-seminomas	Congênito		Diploide Tetraploide
	Gônada disgenética	Disgerminomas Não-seminomas	Adolescentes		Diploide Tri-tetraploide
	Mediastino anterior (timo)	Seminomas Não-seminomas	Crianças (idade média 13 anos)		Diploide Tri-tetraploide
III	Cérebro médio (glândula pineal e hipotálamo)	Germinomas Não-seminomas			
	Testículos	Seminoma Espermatocítico	> 50 anos	Espermatogônias Espermatócitos	Aneuploide (ganho do 9)
IV		Cisto dermoide			
	Ovários	Tumor do saco vitelino Malignidade do tipo somático	Idade reprodutiva (idade média de 30 anos)	Oócito primário	Diploide; raramente tetraploide ou peritriploide com ganho de X, 7, 8, 12 e 15
V	Placenta; geralmente no útero	Ocasionalmente coriocarcinoma	Idade reprodutiva (forte aumento da incidência com a idade)	Óvulo vazio	Diploide (90% XX e 10% XY), raramente tetraploide

Fonte: adaptado de CHENG, et al. 2018.

Enquanto os TCGTs tipo I se manifestam antes da puberdade e o tipo III ocorrem predominantemente em homens idosos e não se relacionam às GCNIS; o TCGTs tipo II, foco deste estudo, surgem em adolescentes e adultos jovens a partir de GCNIS (Figura 2)³⁴.



Fonte: Pinto et al. 2021⁵³

Figura 2 – Representação esquemática dos tipos de TCGT.

Os TCGTs tipo II são subclassificados em dois grandes grupos histológicos: os seminomas e os não seminomas, sendo que os seminomas são formados por células muito semelhantes às GCNIS, com diferenciação suprimida, crescem mais lentamente, são mais sensíveis à radioterapia, apresentam maior incidência entre homens com idades entre 35 e 39 anos e um melhor prognóstico; já os não-seminomas apresentam um comportamento mais agressivo, histologias diferentes devido a uma maior diferenciação (ou seja, carcinoma embrionário, teratoma, tumores do saco vitelino e coriocarcinoma), crescimento mais rápido, uma maior incidência em homens adultos jovens, com faixa etária de 25 a 29 anos³⁰.

1.4 Estratificação do risco dos TCGTs

Para a classificação da extensão nodal primária e regional dos TCGTs, bem como a presença ou ausência de metástases, utiliza-se o estadiamento TNMS, que se assemelha ao sistema TNM (tumor-nódulo-metástase) do *American Joint Committee on Cancer* (AJCC), acrescido da letra S, remetendo aos níveis séricos dos marcadores alfa-fetoproteína (AFP), lactato desidrogenase (LDH) e Gonadotrofina Coriônica humana (hCG), após a orquiectomia³⁵. A partir dos exames de imagem, quantificação dos marcadores tumorais e o estadiamento

correto do tumor, os pacientes com TCGTs são classificados estágio I, no qual a maioria dos pacientes são curados após orquiectomia radical; e estágios II e III, nos quais é necessário a orquiectomia combinada à quimioterapia ou radioterapia³⁶.

Quando a doença acomete unicamente os testículos, apresenta um ótimo prognóstico; no entanto, a caracterização do risco é fundamental para os casos de doença avançada (estágio II e III), uma vez que tratamento convencional não é suficiente para alcançar a cura em alguns casos. Sendo assim, o IGCCCG estratifica os pacientes (estágio II e III) em bom, intermediário e pobre prognóstico apoiado em três critérios principais: localização do tumor primário, os níveis séricos de marcadores tumorais e a presença de metástases viscerais extrapulmonares. Os pacientes de bom prognóstico apresentam taxas de sobrevida de 5 anos em 90% dos casos, enquanto os pacientes de intermediário e mau prognóstico apresentam taxas mais baixas de sobrevida igual a 75% e 50%, respectivamente (Tabela 2)^{37,38}.

Tabela 2 – Classificação prognóstica IGCCCG (doença avançada – estágios II e III).

Prognóstico	Sobrevida 5 anos (%)	Seminoma	Não seminoma
Bom	90	- Qualquer sítio primário e	- Primário testicular ou retroperitônio e
		- Ausência de metástase visceral não pulmonar	- Ausência de metástase visceral não pulmonar e
		- Qualquer nível de marcador	- AFP < 1.000 ng/dl, β-HCG < 5.000 UI/l, LDH < 1.5x nível normal
Intermediário	75	- Qualquer sítio primário e	- Primário testicular ou retroperitônio
		- Presença de metástase visceral não pulmonar (fígado, SNC, osso, intestino)	- Ausência de metástase visceral não pulmonar e
		- Qualquer nível de marcador	- AFP 1.000 a 10.000 ng/dl, β-HCG 5.000 a 50.000 UI/l, LDH < 1.5 a 10x nível normal.
Pobre	50	- Não há seminoma de alto risco	- Primário em mediastino com ou sem primário em retroperitônio e
			- Presença de metástase visceral não pulmonar (fígado, SNC, osso, intestino) e/ou
			- AFP > 10.000 ng/dl e/ou β-HCG > 50.000 UI/l e/ou LDH > 10x nível normal.

Abreviaturas: AFP (Alfa-fetoproteína); LDH (Lactato Desidrogenase); β-HCG (Gonadotrofina Coriônica humana beta); SNC (Sistema Nervoso Central).

Fonte: adaptado de WINTER & ALBERS, 2011³⁸

1.5 Aspectos terapêuticos e a resistência à cisplatina

Os pacientes com suspeita clínica ao exame físico, marcadores típicos elevados e exame ultrassonográfico sugestivo, tem como tratamento primário do TCGT a orquiectomia radical por via inguinal; enquanto no caso de doença metastática é realizada a ressecção cirúrgica do tumor, seguida de radioterapia e/ou quimioterapia a base de platina³⁹. Por via de regra, o regime de tratamento da doença é ditado pelo estadio e grupo histológico (seminoma/não seminoma) do tumor⁴⁰.

A cisplatina foi o primeiro metal pesado, com atividade antineoplásica significativa, a ser usado com sucesso contra câncer de testículo^{41,42}; e a partir dos anos 1970, com a introdução dos regimes de quimioterapia em combinação à base de platina no tratamento de TCGT, as taxas de cura geral com remissão completa do tumor e a sobrevida em 5 anos, aumentaram drasticamente para mais de 80%⁴³⁻⁴⁵.

No entanto, 10-20% dos pacientes com doença avançada são refratários à cisplatina e apresentam um prognóstico menos favorável com recidivas, necessitando de tratamento de segunda linha^{46,47}. Embora a principal causa do desenvolvimento de resistência à cisplatina não tenha sido identificada, alguns mecanismos biológicos relacionados com capacidade de afetar a sensibilidade à cisplatina incluem uma redução na captação da droga; aumento na exportação ou na desintoxicação pela própria célula por meio de uma difusão passiva; reparo inadequado do DNA; perda da função de p53; indução de diferenciação mediada por inibição do gene Oct4; alterações epigenéticas; e superexpressão ou ativação da via PI3K/AKT⁴⁸⁻⁵¹.

1.6 Aspectos moleculares

A composição genética dos TCGTs retrata a característica embrionária das células germinativas primordiais (PGCs) que dão origem a este tipo de tumor. Ainda que a biologia molecular dos TCGTs não esteja totalmente elucidada, os mecanismos moleculares envolvidos no seu desenvolvimento começam a ser definidos⁵²⁻⁵³. Na última década, pesquisas acerca das alterações epigenéticas, expressões de microRNAs, mecanismos de resistência à drogas, instabilidade cromossômica e em relação ao perfil de expressão de genes implicados no surgimento dos TCGTs, têm sido o foco em muitos estudos^{31, 54-58}.

Os TCGTs são caracteristicamente aneuploides, representados por cariótipos hipertriploides a subtetraploides, com o número de cromossomos variando entre 50 e 70^{59,60}. Os ganhos do braço curto do cromossomo 12 (isocromossomo 12p) são os achados

mais consistentes em todos os subtipos histológicos, sendo considerado até então, um importante biomarcador para o TCGT⁶¹⁻⁶³. Outras alterações cromossômicas também foram observadas, envolvendo ganhos recorrentes a nível de braço nos cromossomos 7, 8, 21, 22 e X, como também perdas nos cromossomos 4, 5, 11, 13 e 18⁶⁴⁻⁶⁹.

Embora a taxa de mutações somáticas recorrentes em TCGTs seja baixa, variantes em *KIT* e *KRAS* são frequentemente descritas, sugerindo que mutações nestes genes sejam as principais condutoras dos TCGs^{70,71}. Mutações em *KIT* e *KRAS* foram relatadas com maior frequência em seminomas, quando comparadas aos não seminomas^{69,72,73}; elevados níveis de expressão e amplificação do gene *KRAS* foram descritos como eventos mutuamente exclusivos em TCGTs^{74,75}.

Mutações no gene *TP53* foram pouco citadas em TCGTs e, quando presentes, foram associadas à resistência à cisplatina, principalmente em casos de TCGs mediastinais não-seminomatosos^{32,71,76,77}. A variante *BRAF* (V600E) não foi encontrada em TCGTs sensíveis e resistentes à cisplatina, mostrando que essa variante não é uma característica dos TCGTs⁷⁸⁻⁸¹; enquanto mutações nos genes *FGFR3*, *AKT1* e *PIK3CA* foram associadas a TCGTs resistentes à cisplatina⁸². A via PDGFR β -AKT desempenha um papel importante na resistência à cisplatina; visto que, quando sua ativação foi bloqueada, as células resistentes à cisplatina se comportaram como células sensíveis⁸³.

1.7 RAS/KRAS

Os genes da família *RAS* são considerados protooncogenes, uma vez que alterações nele contribuem para o desenvolvimento tumoral. As principais mutações que ocorrem neste gene, tornam a proteína permanentemente hiperativa, fazendo com que as vias de sinalização influenciadas por ela se tornem constantemente ativas⁸⁴. O gene *RAS* foi o primeiro oncogene identificado e atualmente demonstrou ser o gene mais mutado dentre os oncogenes conhecidos. Estima-se que aproximadamente 30% dos tumores em humanos têm formas mutantes hiperativas de *RAS*, o que contribui para a proliferação descontrolada das células cancerosas. Tais mutações são encontradas em diversos tipos de cânceres, principalmente naqueles com alto índice de mortalidade, como o pancreático (70-90%), cólon (20-30%) e pulmonar (20-35%)⁸⁵.

A proteína *RAS* atua como centro de sinalização, pois ao se tornar ativa, esta pode difundir o sinal estimulatório para diferentes vias de sinalização, por exemplo a via das *MAP-*

quinases e *PI3K*, uma vez que no final do processo sinalizador tem-se a proliferação e a diferenciação celular. Nos seres humanos, há três principais proteínas RAS: HRAS, KRAS e NRAS. Elas atuam como comutadoras moleculares, revezando entre dois estados conformacionais distintos – ao se ligarem ao GTP se tornam ativas e quando se ligam ao GDP se tornam inativas⁸⁶. O *KRAS* é uma GTPase monomérica pertencente a superfamília das proteínas *RAS* e está envolvido com a transmissão de sinais dos receptores de superfície da membrana^{84,86}.

No câncer testicular, as mutações nos genes da família RAS são mais comuns em seminomas, quando comparados aos não-seminomas⁸⁷⁻⁸⁹. Contudo, tem se levantado a hipótese de que alterações neste gene podem estar associadas à doença testicular quimiorresistente⁹⁰. Segundo um estudo realizado com pacientes quimiossensíveis e quimiorresistentes com o intuito de identificar alterações que possam levar a resistência quimioterápica foi suposto que a quimiossensibilidade estaria relacionada à presença de um gene *TP53* não alterado e, portanto, sua variante estaria ligada à resistividade, porém ao analisar as amostras de pacientes resistentes não se identificou uma alteração significativa neste gene, mas sim no gene *KRAS*⁹¹.

2 JUSTIFICATIVA

Embora seja uma doença altamente curável e quimiosensível, deve-se levar em conta que os TCGT de alto risco e, principalmente, os casos refratários ao tratamento, levam a um cenário desafiador na prática clínica, por acometer uma população jovem em plena idade laborativa e reprodutiva. Comparado a outros tipos de tumores sólidos, os mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento dos TCGTs têm sido pouco estudados, mas vem recebendo maior atenção nas últimas três décadas. A insurgência da doença refratária nos impulsiona a realizar uma avaliação mutacional deste tipo de tumor em uma série de casos brasileiros, uma vez que possa haver diferenças e particularidades em relação a populações já estudadas, majoritariamente europeias; bem como uma melhor caracterização molecular e genética desta entidade em linhagens celulares, dado que o estudo em modelos de resistência estabelecidos *in vitro* podem servir futuramente como modelo clínico para a avaliação de novas estratégias terapêuticas. Posto isso, a compreensão molecular desta doença poderá conduzir a assinaturas que delinearão o tratamento para uma ação mais específica e efetiva, com um perfil de tolerância ao tratamento que justifique a relação entre risco e benefício, além da possibilidade de agregar informação prognóstica mais sensível. Tendo em vista que alterações moleculares podem estar associadas à resposta ao tratamento, a busca por ferramentas prognósticas e preditivas mais sensíveis deve ser o caminho para caracterizar e estratificar melhor os TCGTs em tratamento primário e, principalmente, os casos refratários, o que iria proporcionar um guia mais adequado para o manejo médico desta entidade.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a possível associação de alterações moleculares nos TCGTs com as características clínico-patológicas e desfechos clínicos dos pacientes que sofrem desta enfermidade.

3.2 Objetivos específicos

- Descrever a sobrevida global dos pacientes.
- Estabelecer o fenótipo de resistência à cisplatina em uma linhagem celular de TCGT (JEG3).
- Identificar a presença de variantes em genes, nos pacientes e em linhagens celulares de TCGT resistentes à cisplatina (NTERA-2R e JEG3-R).
- Identificar a variação no número de cópias do gene *KRAS* nos pacientes.
- Comparar as variantes encontradas, entre os grupos de interesse.
- Descrever as variáveis clínicas, moleculares e genéticas e compará-las com as variantes encontradas e variações no número de cópias do gene *KRAS*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Delineamento do estudo

Estudo observacional retrospectivo, no qual uma coorte de pacientes com Tumor de Células Germinativas de Testículo, do Hospital de Amor de Barretos, foi avaliada a partir de dados clínicos e moleculares, de acordo com os objetivos do estudo (Figura 3).

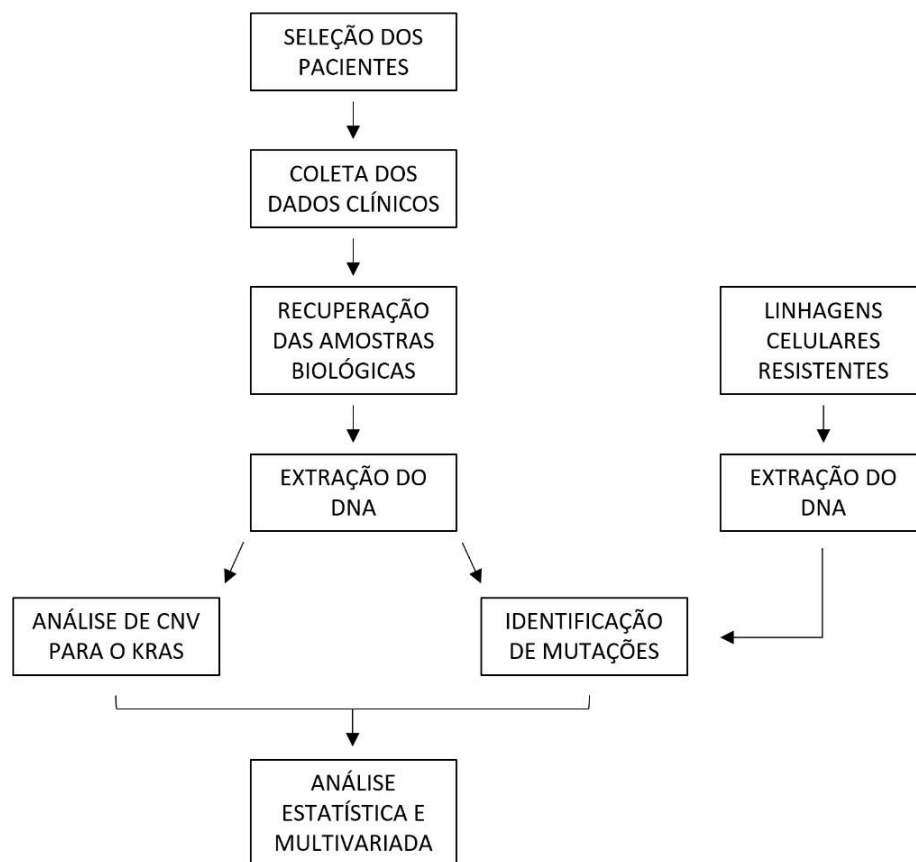


Figura 3 – Fluxograma da estratégia experimental do projeto.

4.2 População de estudo

De 704 pacientes diagnosticados com TCGT no período de janeiro de 2001 a dezembro de 2016 no HA, um total de 97 pacientes foram incluídos no estudo, respeitando os critérios de inclusão e exclusão, bem como os critérios do controle de qualidade, como a porcentagem de tumor > 80% e necrose < 20% (Figura 4). Foram considerados os seguintes critérios de inclusão e exclusão no estudo:

Critérios de Inclusão

- Idade maior ou igual a 18 anos;
- Orquiectomia realizada por via inguinal ou laparotomia para testículo criptorquídico;
- Diagnóstico histológico de TCG do testículo;
- Medidas de hCG, AFP e LDH ao diagnóstico, antes e após tratamento;
- Material biológico disponível.

Critérios de Exclusão

- TCG extragonadal;
- Presença de outra neoplasia maligna primária, com exceção de tumores de pele não-melanoma;
- Pacientes com sorologia positiva para o vírus HIV;
- Pacientes em uso crônico de agentes imunossupressores.

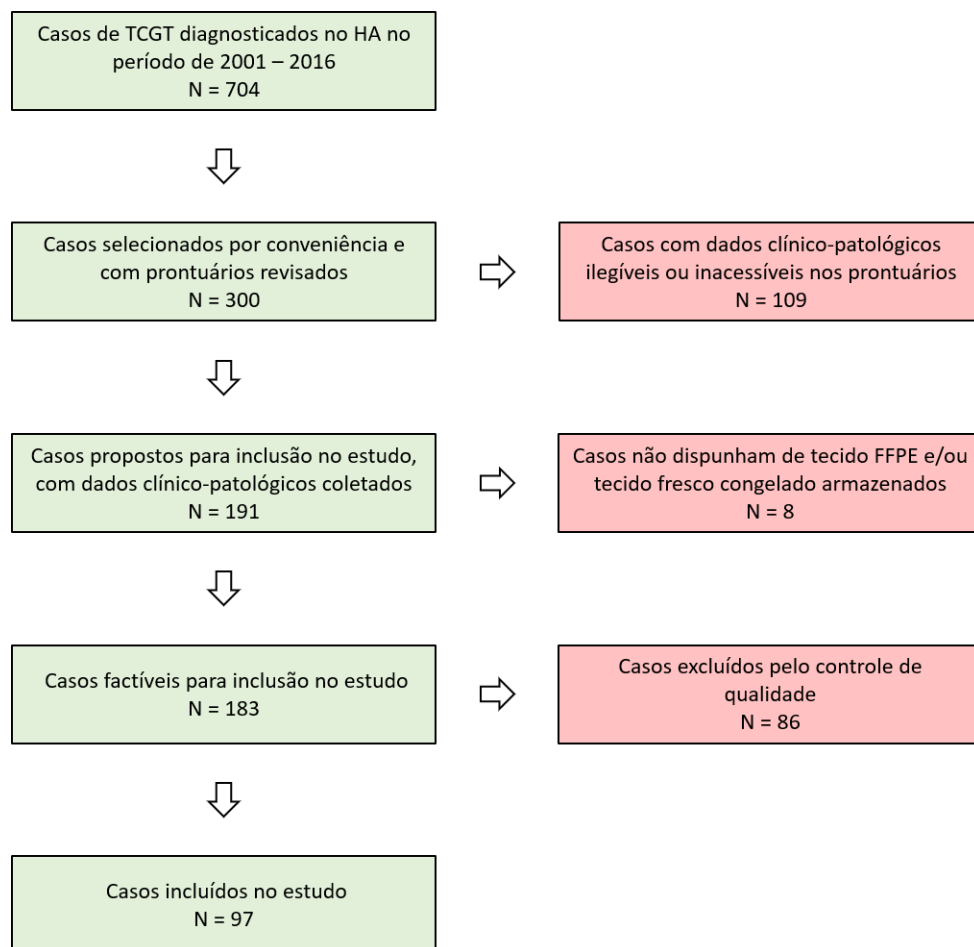


Figura 4 – Fluxograma da população incluída no estudo.

4.3 Coleta de dados clínicos

A população do estudo foi selecionada a partir dos dados de Registro Hospitalar do HA e por meio de documentos de Autorização para Procedimentos de Alta Complexidade (APACs). Foram considerados documentos fonte, os prontuários arquivados no Serviço de Arquivo Médico e Estatística (SAME) do HA e segundas vias dos exames dos laboratórios de suporte, caso estes estivessem referenciados em prontuário, mas ilegíveis ou inacessíveis. Todos os dados clínico-patológicos foram registrados em um banco de dados na plataforma REDCap, sob tutela do investigador principal.

4.4 Recuperação das amostras biológicas

Amostras de tecido fixado em formalina e embebido em parafina (Formalin Fixed Paraffin Embedded – FFPE), provenientes de tumores primários de testículo, foram utilizadas para análises da presença de variantes; e amostras de tecido fresco congelado, também provenientes de tumores primários de testículo, foram utilizadas para análises de variação de número de cópias do gene *KRAS*. As linhagens celulares NTERA-2 e JEG3 parentais, foram obtidas comercialmente a partir da Coleção Europeia de Culturas de Células Autenticadas (*European Collection of Authenticated Cell Cultures - ECACC*, Salisbury, United Kingdom).

4.4.1 Amostras de tecido FFPE

As amostras de tecido FFPE foram recuperadas por meio do número de registro de bloco de parafina, no Serviço de Patologia do HA. Todos os casos foram revisados por um Patologista independente e quando houve divergência entre o laudo registrado e o laudo emitido pela análise atual, esta última foi tida como válida para os fins do estudo.

Entre os 183 casos diagnosticados com TCGT e factíveis para a inclusão neste estudo, 75 não atendiam aos critérios do controle de qualidade para extração de DNA. Logo, a extração do material genético foi possível para 108 casos. Destes, 12 casos não apresentavam DNA íntegro e de boa qualidade e por esse motivo não poderiam seguir para o preparo de bibliotecas para sequenciamento. Das 96 amostras que seguiram para o preparo de bibliotecas, 32 não tiveram seus alvos amplificados. Por fim, somente 65 casos foram incluídos para as análises de identificação de variantes por Sequenciamento de Nova Geração (*New Generation Sequencing – NGS*) (Figura 5).

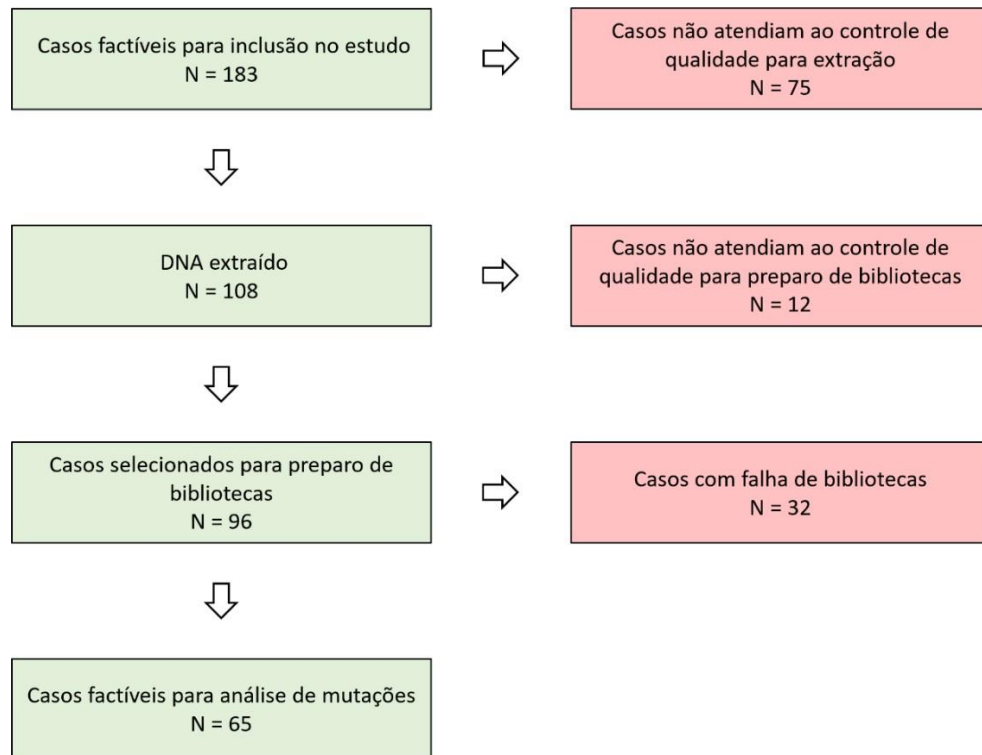


Figura 5 – Fluxograma de casos factíveis para análise de mutações por sequenciamento NGS.

4.4.2 Amostras de tecido fresco congelado

As amostras biológicas de tecido fresco congelado, provenientes de tumores primários de testículo e utilizadas para análises de variação de número de cópias do gene *KRAS*, foram recuperadas através do número de registro hospitalar (RH) do paciente, no Serviço de Biobanco do HA.

Entre os 183 casos diagnosticados com TCGT e factíveis para a inclusão neste estudo, 117 casos possuíam amostras de tecido fresco congelado disponíveis no Biobanco. Após a revisão das lâminas de H&E destes 117 casos pelo patologista, somente 51 casos foram selecionados para análises da Variação do Número de Cópias (*Copy Number Variation* – CNV) por PCR em tempo real (qPCR), uma vez que 66 casos não atendiam aos critérios do controle de qualidade do Biobanco e/ou eram amostras pós-QT (Figura 6).

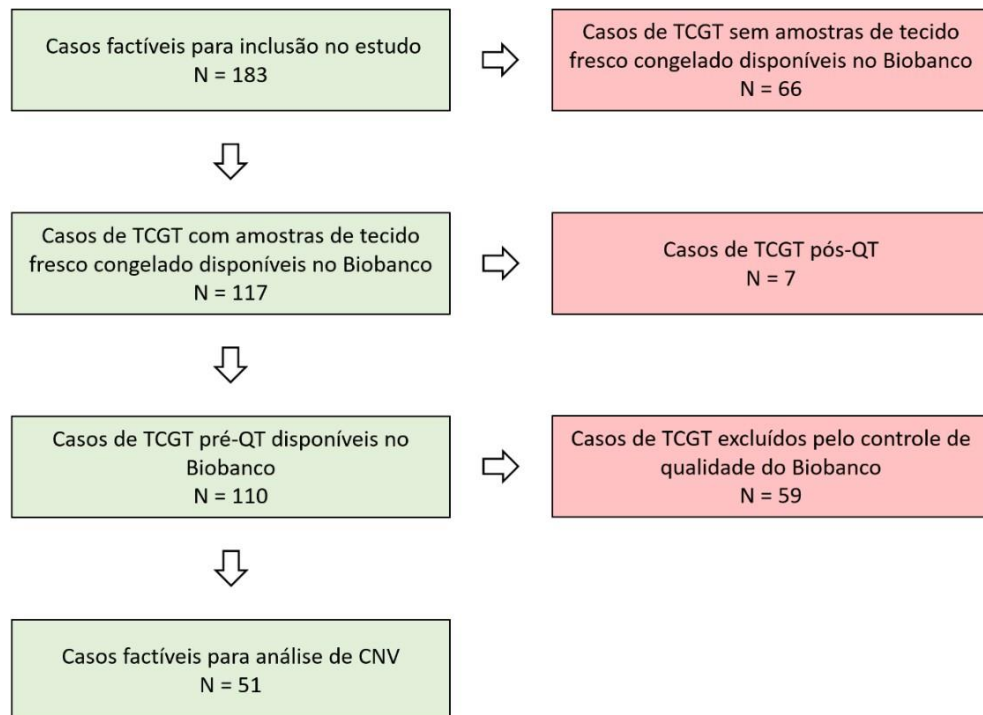


Figura 6 – Fluxograma de casos factíveis para análise de CNV por qPCR.

4.5 Linhagens celulares de TCGT

Um modelo de resistência à cisplatina da linhagem NTERA-2, desenvolvido *in vitro* pelo Grupo de Pesquisa em Oncologia Pediátrica (GPOPed) do HA foi utilizada neste estudo; e um modelo de resistência à cisplatina da linhagem JEG3 também foi estabelecido, utilizando a mesma estratégia.

De uma forma geral, a linhagem celular JEG3 parental foi cultivada em meio DMEM (Life Technologies) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF) (Life Technologies) e 1% de Penicilina/Streptomicina (Life Technologies), a 37°C, 5% de CO₂ e 90% de umidade, até atingir confluência. Após confluência, as células foram tripsinizadas (solução tripsina 0,05% / EDTA 0,53 mM- TripLE Express, Life Technologies), plaqueadas e tratadas com cisplatina. As células foram testadas regularmente para contaminação com micoplasma (protocolo institucional), e tiveram sua autenticidade comprovada pelo teste de STR (protocolo institucional).

4.6 Estabelecimento do fenótipo de resistência

A fim de criar um modelo de resistência à cisplatina também para a linhagem JEG3, utilizamos a mesma estratégia de exposição das células ao fármaco, com doses incrementais, utilizada no desenvolvimento do modelo da linhagem NTERA-2.

Para isso, inicialmente foi estabelecido os valores IC₁₀, IC₂₅ e IC₅₀ da linhagem JEG3. Os valores correspondem às doses da droga, tipicamente expressas em concentração molar, capazes de inibir, *in vitro*, 10%, 25% e 50% da viabilidade celular, respectivamente, e foram determinados a partir do ensaio de viabilidade celular (MTS).

A viabilidade celular foi avaliada com o *Cell Titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay* (Promega – REF G358C), que consiste em um método colorimétrico utilizado para a determinação do número de células viáveis em ensaios de proliferação, citotoxicidade ou quimiossensibilidade, baseado na biorredução do composto tetrazólio [3-(4,5-diMETiltiazol-2-il)-5-(3-carboxiMEToxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio, sal interno; MTS] e um reagente acoplador de elétrons (etossulfato de fenazina; PES). A combinação do PES com o MTS leva à formação de produtos de formazan, uma solução estável colorida cuja absorbância é proporcional ao número de células viáveis. As células mantidas em cultura (passagens 3 e 4) foram desagregadas segundo o protocolo de cultivo celular já descrito e quantificadas em contador de células automatizado Countess (Invitrogen), utilizando o reagente Azul de Tripán (Invitrogen – REF T10282).

Um total de 5×10^3 células foram semeadas por poço em uma placa de 96 poços com 100 μ L de meio DMEM 10% e mantidas em condições controladas de cultivo. Após 24 horas de incubação o meio de cultura foi retirado e oito pontos de tratamento foram determinados (0; 0,5; 1; 5; 10; 15; 30 e 50 μ M) e preparados a partir de uma solução-mãe de cisplatina (5.000 μ M) em meio DMEM 10%. As diluições da droga em concentrações crescentes, bem como o controle negativo sem cisplatina (somente veículo – NaCl 0,9%) foram adicionados aos poços. Após 72 horas, o tratamento foi interrompido, as células foram incubadas com o reagente MTS por 3 horas e a absorbância foi lida a 490 nm em leitor de placa de ELISA (Varioskan Flash - Thermo Scientific).

Os valores brutos das absorbâncias foram convertidos em porcentagens e normalizados em relação às absorbâncias das amostras controle tratadas apenas com NaCl 0,9%. Por fim, foi realizada uma análise de regressão não linear pelo programa Graphpad Prism versão 5.01. O ensaio foi realizado em triplicata experimental e duplicata biológica.

Posteriormente à determinação dos valores IC₁₀, IC₂₅ e IC₅₀, as células da linhagem JEG3 em cultura foram lavadas com DPBS, desagregadas, distribuídas em quatro frascos de cultura com meio DMEM 10% e incubadas em condições controladas de cultivo. Após atingirem 80 - 90% de confluência, três destes frascos de cultura foram tratados com as doses 0,087 μ M

(IC₁₀), 0,528 μ M (IC₂₅) e 3,024 μ M (IC₅₀) por 72 horas para avaliar a melhor concentração a partir da qual os tratamentos se iniciariam; enquanto as células do quarto frasco foram mantidas em cultura e sem tratamento com cisplatina para controle (Figura 7a).

Após o tratamento, a monocamada de células foi lavada com DPBS e meio DMEM 10% sem droga foi adicionado para recuperação das células. Observou-se que aquelas tratadas com a dose de 0,087 μ M (IC₁₀) e 0,528 μ M (IC₂₅) se recuperaram melhor do tratamento. Assim, escolhemos a dose de IC₂₅ como a dose ideal para se iniciar o estabelecimento do fenótipo de resistência à cisplatina, por ser a maior dose.

As células tratadas com a dose IC₂₅ já se encontravam recuperadas do primeiro tratamento após 48 - 72 horas e com uma confluência de 80 - 90% no frasco de cultura, momento apropriado para repetição do tratamento com essa mesma dose por mais 72 horas, para seleção dos clones resistentes. O protocolo (tratamento e repetição do tratamento) foi repetido por um longo período (9 meses), com doses crescentes – aumento de 2 μ M a cada novo tratamento – de cisplatina e respeitando o tempo de recuperação da linhagem JEG3 para cada tratamento (Figura 7b). As células foram tratadas até a obtenção de um IC₅₀ aproximadamente 8 vezes maior em relação à linhagem parental – dose final de tratamento igual a 12,0 μ M – uma vez que os modelos de resistência à cisplatina atualmente existentes apresentam taxas de resposta semelhantes ou menores.

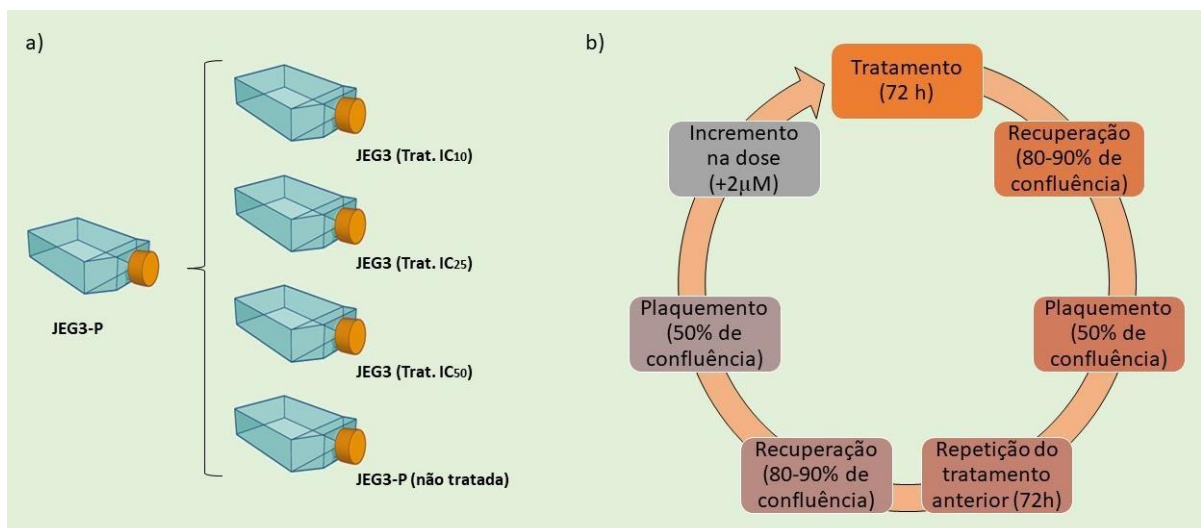


Figura 7 – Estabelecimento do fenótipo de resistência. a) Distribuição das células em frascos de cultura T25 e tratamento da linhagem JEG3 parental (JEG3-P) com as doses 0,087 μ M (IC₁₀), 0,528 μ M (IC₂₅) e 3,024 μ M (IC₅₀), para avaliar a melhor concentração a partir da qual os

tratamentos se iniciariam. b) Estratégia de tratamentos da linhagem JEG3 com a droga cisplatina para estabelecimento da linhagem resistente.

4.7 Extração do DNA

O DNA de três tipos de amostras foi utilizado para as análises, segundo as metodologias propostas: DNA de tecido FFPE e DNA celular para análises de mutações por NGS; e DNA de tecido fresco congelado para as análises de variação do número de cópias do gene *KRAS* por qPCR.

A desparafinização das amostras de tecido FFPE e a extração de DNA das secções representativas das lesões tumorais foi realizada utilizando xilol e QIAamp DNA FFPE Tissue KIT (Qiagen), respectivamente. Inicialmente, secções de 10 µm de espessura dos blocos de parafina foram recuperadas e uma lâmina corada com H&E foi usada para identificação e seleção da área tumoral, por um Patologista. Para cada bloco de parafina, foram utilizados dois a três cortes histológicos com no mínimo 70% de tumor e no máximo 20% de necrose, para a extração do DNA. As lâminas contendo os cortes histológicos foram levadas à estufa a 80 °C por 20 minutos, para remoção da parafina; seguido de duas lavagens de 5 minutos em solvente xilol para solubilização da parafina; mais três lavagens seriadas de 1 minuto em etanol (100% - 70% - 50%) e uma lavagem de 1 minuto em água ultrapura, para reidratação do tecido. Com o auxílio de uma agulha estéril (Neolus, 25G - 0.5mm) e das lâminas coradas em H&E utilizadas como molde, a área tumoral das lâminas então desparafinizadas foi coletada em microtubos previamente identificados. O DNA das amostras de FFPE foi extraído usando o *QIAamp® DNA FFPE Tissue KIT (Qiagen)* conforme as instruções do fabricante, quantificado em equipamento *Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen)* e estocado a -20°C até as análises propostas.

O DNA das amostras de tecido congelado foi extraído usando o *DNeasy Blood & Tissue KIT (Qiagen® Hilden-Germany)*, conforme instruções do fabricante, quantificado em equipamento NanoDrop (Thermo Scientific) e estocado a -20°C até as análises propostas.

O DNA das linhagens celulares foi extraído usando o *BIOPUR KIT Extração Mini Spin Plus*, conforme as instruções do fabricante, quantificado em equipamento NanoDrop (Thermo Scientific) e estocado a -20°C até as análises propostas.

4.8 Análise de CNV do gene *KRAS* por qPCR

A análise da variação no número de cópias do gene *KRAS*, foi realizada para um total de 51 pacientes diagnosticados com TCGT, e que possuíam amostras de tecido fresco congelado disponíveis no Biobanco do HA.

Foi utilizado um ensaio TaqMan específico para o gene *KRAS* (Hs02739788_cn – Thermo Fisher Scientific); e o gene de referência Ribonuclease P (RNase P 4403326 – Thermo Fisher Scientific), localizado no cromossomo 14 e conhecido por conter duas cópias no genoma humano, para calcular o número de cópias do gene alvo e comprovar que a reação de qPCR foi amplificada com êxito. Como controles do número de cópias de *KRAS*, foram utilizados o DNA da linhagem celular de TCG (NTERA-2) com número de cópias do gene *KRAS* já conhecido (5 cópias) e uma amostra de sangue normal (2 cópias), respectivamente.

As reações de qPCR foram realizadas seguindo protocolo padronizado no Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular (CPOM), contendo 20 ng de DNA, 10 μ L *TaqMan Genotyping Master Mix* (Thermo Fisher Scientific), 1,0 μ L de sondas e iniciadores das região específicas e de controles e, por fim, água ultrapura livre de nucleases, completando o volume final total para 20 μ L. Os ensaios para o número de cópias foram executados simultaneamente com o ensaio de referência em uma duplex qPCR, em equipamento QuantStudio 6 (Thermo Fisher Scientific) e ciclagem com temperatura inicial de 95°C durante 10 minutos, seguido por 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos, 60°C durante 1 minuto.

O ensaio *TaqMan*[®] *KRAS Copy Number*, continha dois primers e uma sonda MGB marcada com corante FAM[™] para detectar a sequência alvo do DNA genômico; e o ensaio de referência RNase P continha dois primers e uma sonda marcada com corante VIC[®] e TAMRA[™] para detectar a sequência de referência de DNA genômico.

Os valores de Ct de cada amostra e gene de referência foram exportados para o software *CopyCaller*[™] (Applied BioSystems, EUA), no qual foi realizada uma análise comparativa de quantificação Ct ($\Delta\Delta$ Ct) dos dados em tempo real. O método comparativo de Ct ($\Delta\Delta$ Ct) calculou a diferença (Δ Ct) entre os ciclos de limiar das sequências de ensaio alvo e de referência e, em seguida, comparou os valores de Δ Ct das amostras de teste com uma amostra do calibrador (sangue normal), que continha um número conhecido de cópias da sequência alvo (2 cópias). Todas as reações, em todas as placas, foram realizadas em triplicatas técnicas.

4.9 Análise de mutações por NGS

4.9.1 Avaliação da qualidade e integridade do DNA extraído de tecido FFPE

Visto que o DNA extraído de amostras de tecidos FFPE apresenta uma baixa qualidade, observou-se a necessidade de um controle interno que avaliasse a integridade do material genético extraído e sua possível utilização nas análises de variantes por NGS. Para tal, foi realizada uma PCR multiplex para quatro regiões-alvo do gene constitutivo *GAPDH* (cromossomo 12), já padronizada no Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular (CPOM). Na Tabela 3 estão descritas as sequências dos primers utilizados para as regiões de interesse e o tamanho dos fragmentos gerados.

As amplificações foram realizadas com um volume final de 30 µL, contendo 1,5 mM de MgCl₂ (Invitrogen); 0,2 mM de dNTPs (Invitrogen); 0,133 µM de cada primer; 1 unidade de Taq DNA Polimerase (Invitrogen) e 50 ng de DNA tumoral. As reações foram realizadas no termociclador ProFlex (Thermo Fisher Scientific) utilizando os seguintes parâmetros de amplificação: 94°C por 4 minutos, 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 56°C por 1 minuto, e 72°C por 1 minuto. Por fim, uma extensão final de a 72°C por 7 minutos, terminando a 15°C. O sucesso da amplificação do DNA foi verificado por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado em *GelRed™*, visualizado sob luz ultravioleta e documentado. As amostras que apresentaram bandas em 200 pb ou mais, foram aceitas como de boa qualidade para o preparo das bibliotecas de sequenciamento.

Tabela 3 - Sequência dos primers para PCR Multiplex do gene *GAPDH* e tamanho dos fragmentos gerados.

Primers	Sequência Forward (5' – 3')	Sequência Reverse (3' – 5')	Tamanho dos fragmentos (pb)
1	GTT CCA ATA TGA TTC CAC CC	CTC CTG GAA GAT GGT GAT GG	100bp
2	AGG TGG AGC GAG GCT AGC	TTT TGC GGT GGA AAT GTC CT	200bp
3	AGG TGA GAC ATT CTT GCT GG	TCC ACT AAC CAG TCA GCG TC	300bp
4	ACA GTC CAT GCC ATC ACT GC	GCT TGA CAA AGT GGT CGT TG	400bp

4.9.2 Preparo de bibliotecas e sequenciamento NGS

Para avaliação da presença de mutações foi utilizado o painel *TruSight Tumor 15* (*Illumina®*), conforme instruções do fabricante. O painel fornece uma avaliação abrangente

de 15 genes (*TP53*, *KRAS*, *KIT*, *NRAS*, *BRAF*, *EGFR*, *MET*, *PIK3CA*, *PDGFRA*, *AKT1*, *ERBB2*, *RET*, *GNA11*, *GNAQ* e *FOXL2*) comumente mutados em tumores sólidos, detectando com precisão variantes somáticas de baixa frequência e com a vantagem de ser um painel otimizado para utilização de amostras de tecido FFPE. Os éxons cobertos pelo painel *Trusight Tumor 15* encontram-se detalhados na Tabela 4.

Tabela 4 - Éxons cobertos pelo painel *Trusight Tumor 15*.

Gene	Éxons
<i>KIT</i>	Éxons 8, 9, 10, 11, 13, 14, 17 e 18
<i>TP53</i>	Sequência de codificação completa
<i>PDGFRA</i>	Éxons 12, 14 e 18
<i>KRAS</i>	Éxon 2 (região hotspot), 3 (região hotspot), 4
<i>NRAS</i>	Éxon 2 (região hotspot), 3 (região hotspot), 4 (códon 12, 13, 59, 61, 117, 146)
<i>EGFR</i>	Éxons 12 (parcial), 18, 19, 20, 21 e amplificação focal
<i>MET</i>	Amplificação focal
<i>PIK3CA</i>	Éxons 9 e 20
<i>AKT1</i>	Éxon 3
<i>BRAF</i>	Éxon 15 (parcial)
<i>RET</i>	Éxon 16
<i>ERBB2</i>	Éxons 14 (parcial), 17, 18, 19, 20 (parcial), 21 (parcial), 24 e 26
<i>FOXL2</i>	Éxon 1 (parcial)
<i>GNAQ</i>	Éxon 5 (região hotspot)
<i>GNA11</i>	Éxon 5 (região hotspot)

Para o preparo das bibliotecas, inicialmente todas as amostras foram quantificadas em equipamento *Qubit® 2.0 FluoroMETer (Invitrogen)* e os alvos enriquecidos em uma PCR *multiplex*, com um *input* inicial de 20 ng/μL de DNA, segundo as instruções do fabricante. Em seguida, às extremidades dos alvos amplificados e com sequências de tag, foram adicionados adaptadores e indexes, em um processo denominado indexação dos alvos. Estes adaptadores, além de sequências específicas que identificam o DNA de cada paciente em um *pool* de amostras, são constituídos de primers iniciadores e os adaptadores que se ligam por complementariedade aos oligonucleotídeos que revestem a *flowcell*, na etapa de clusterização.

Após o preparo das bibliotecas, o sucesso da amplificação do DNA foi verificado por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado em GelRed™, visualizado sob luz ultravioleta e documentado. As bibliotecas que tiveram seus alvos amplificados e apresentaram bandas entre 200 e 350 pb, foram diluídas a 2nM em um *pool* de amostras que, por sua vez, foi

desnaturado e então diluído a uma concentração final de 8 pM e transferidas para o equipamento MiSeq (*Illumina*), onde ocorre a etapa de clusterização, momento em que estas bibliotecas são amplificadas por PCR em ponte e aglomerados (*cluster*) de inúmeras cópias são formados.

Por fim, após a formação dos *clusters*, deu-se o sequenciamento propriamente dito, no qual as moléculas de DNA foram sequenciadas base a base, simultaneamente, por meio de quatro nucleotídeos fluorescentes. Os quatro nucleotídeos competem uns com os outros para se ligar ao alvo, garantindo a alta precisão do sequenciamento. No momento do sequenciamento, os nucleotídeos fluorescentes foram então excitados por um laser, de modo que a cor obtida identificasse a base adicionada. Assim, cada uma das quatro bases de DNA emitiam a intensidade de um único comprimento de onda, que permitia identificar a sequência de bases sequenciadas.

Finalizado o sequenciamento, todas as informações foram enviadas automaticamente ao *BaseSpace* (plataforma de análises *Illumina*), onde todos os dados da sequência e qualidade da corrida foram analisados e armazenados no formato de arquivos FASTQ. Estes arquivos foram então utilizados como *input* na plataforma de análise da *Varstation*[®], para a execução do alinhamento, chamada e anotação de variantes das amostras sequenciadas, utilizando como referência o genoma hg19 (versão GRCh37).

4.9.3 Alinhamento e chamada de variantes

Os dados do sequenciamento dos éxons cobertos pelo painel Trusight Tumor 15 foram processados por meio de um *pipeline* customizado pela plataforma de análise *Varstation*[®]. Para o alinhamento e mapeamento das sequências contra o genoma de referência humano hg19 (versão GRCh37) foi utilizado o *software* BWA, que consiste em três algoritmos: *BWA-backtrack*, *BWA-SW* e *BWA-MEM*. No *pipeline* aplicado às análises deste trabalho, foi utilizado o algoritmo *BWA-MEM-PAIRED*, projetado para leituras de sequência *Illumina* que variaram de 70bp a 1Mbp; e os arquivos no formato de saída *Sequence Alignment Map* (SAM) foram convertidos para o formato *Binary SAM* (BAM) usando o *SAMtools*.

A chamada de variantes somáticas foi realizada usando o conjunto de ferramentas bioinformáticas Genome Analysis ToolKIT – GATK (*GATK UnifiedGenotyper using BED*, *GATK Mutect2 using BED*, *GATK4 Haplotypecaller using BED*) utilizados para detectar SNPs e indels simultaneamente e filtrar os mesmos; e o detector de variantes genéticas *Freebayes using*

BED – Capture, projetado para encontrar pequenos polimorfismos, especificamente SNPs, indels, polimorfismos de multi-nucleotídeos e eventos complexos (eventos de inserção e substituição compostos) menores que o comprimento de um alinhamento de sequenciamento de leitura curta.

Visto que o presente trabalho visa uma caracterização molecular dos TCGTs, foi utilizado um filtro de análises personalizado, que retinha variantes patogênicas, provavelmente patogênicas, de significado incerto/desconhecido (*Variant of Uncertain/Unknown Significance – VUS*) e de resposta à drogas; com frequência populacional menor que 1% em qualquer banco populacional (gnomAD, 1000 genomas, ABRaOM); frequência alélica (VAF) maior ou igual a 3% (VAF padronizado no setor de Diagnóstico Molecular) e a cobertura vertical (profundidade) maior ou igual a 500x nas regiões exônicas e de splicing; do tipo frameshift, não sinônimas e stopgain.

4.9.4 Anotação das variantes

A anotação das variantes foi realizada pela plataforma de análise *Varstation*[®], utilizando o *software Varstation Annotation Somatic*; e uma curadoria manual das variantes foi realizada nos bancos de dados de públicos Clinvar, IARC *TP53*, Varsome, COSMIC, gnomAD e CGI para a melhor classificação das variantes encontradas e conseqüentemente caracterização quanto ao seu efeito, patogenicidade e frequência na população. Foram mantidas como resultado final apenas as variantes consideradas como patogênicas, provavelmente patogênicas, ou de resposta a drogas, conhecidas e/ou preditas como *drivers*.

4.10 Variáveis do estudo

Foram utilizadas como variáveis do estudo os seguintes dados clínicos como se segue:

- Idade, naturalidade, lateralidade do tumor, tipo histológico, predomínio histológico nos tumores mistos e invasão linfo-vascular.
- Estádio TNMS, risco IGCCCG, níveis séricos e cinética da AFP, hCG e LDH durante o tratamento.
- Localização das metástases e status de sensibilidade à platina.
- Tipos de quimioterapia, linhas de utilização de quimioterapia e ressecção cirúrgica de doença residual.

4.11 Análise estatística

A descrição da amostra foi feita através de medidas de frequência, tendência e dispersão. Análise univariada foi utilizada para comparar categorias da amostra em relação às frequências de mutações. Para isso, foram utilizados o teste do χ^2 ou o teste exato de Fischer de acordo com a característica da amostra. Curvas de sobrevida foram plotadas por meio do método de Kaplan-Meier e foram considerados eventos de interesse para o desfecho Sobrevida Global, o registro de morte. Foram consideradas razões para censura o registro de perda de seguimento ou paciente vivo na pré-análise dos dados.

Comparações univariadas de tempos de sobrevida foram realizadas através do teste de *log rank*. Utilizamos o programa SPSS 2.0 para a análise dos dados, e aplicado um alfa=0.05 com um poder de 80% em um teste de hipótese bicaudal.

5 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Todas as informações referentes ao estudo foram mantidas em sigilo, sob a responsabilidade do investigador principal. O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), situado no Hospital de Amor de Barretos e encontra-se aprovado sob o número CAAE 12297713.0.0000.5437. Foi solicitada a dispensa do Termo de Esclarecimento Livre e Esclarecido (TCLE), por tratar-se de estudo retrospectivo, sem prejuízos ou benefícios diretos aos sujeitos da pesquisa. Material Biológico Humano foi utilizado nesta pesquisa a partir do Serviço de Patologia do Hospital de Amor de Barretos, em acordo com a Resolução do Conselho Nacional de Saúde Nº 441.

6 RESULTADOS

6.1 Caracterização da amostra

A partir da revisão retrospectiva dos prontuários dos pacientes diagnosticados com TCGT no Hospital de Amor de Barretos, fez-se o levantamento dos dados demográficos e clínico-patológicos dos 97 casos incluídos neste estudo, os quais são apresentadas na Tabela 5.

A média de idade ao diagnóstico foi de 32,5 anos e a maioria dos casos (57,7%) era composta por não-seminomas. Dentre o grupo histológico de tumores não seminomatosos, 41,2% apresentaram a histologia de tumores mistos, ou seja, com duas ou mais histologias presentes. A maior parte dos casos (67%), encontravam-se em estágios avançados da doença – estadio II e III – segundo a AJCC, sendo 27,9% de risco intermediário e alto, segundo o IGCCCG. A estratégia de tratamento mais utilizada foi a combinação PEB (Bleomicina + Etoposide + Cisplatina) e 6,2% dos casos apresentaram refratariedade a algum dos regimentos quimioterápicos. Os casos para a qual a quimiossensibilidade não se aplica (25%) corresponde àqueles em estadio I e IS que não fizeram quimioterapia; e os casos ignorados (4,1%) correspondem àqueles que vieram a óbito antes da data marcada para o primeiro ciclo de quimioterapia adjuvante.

Tabela 5 – Características dos pacientes com TCGT do Hospital de Amor de Barretos.

Características	Pacientes
	n (%)
TCGT	97
Idade	
< 30 anos	49 (50,5%)
≥ 30 anos	48 (49,5%)
Grupo histológico	
Não seminoma	56 (57,7%)
Seminoma	41 (42,3%)
Histologia	
Não seminoma puro	16 (16,5%)
Seminoma puro	41 (42,3%)
Tumor misto	40 (41,2%)
Estadio (AJCC)	
IS	7 (7,2%)
I	25 (25,8%)
II	27 (27,8%)
III	38 (39,2%)

Risco (IGCCCG)	
Baixo	38 (39,2%)
Intermediário	15 (15,5%)
Alto	12 (12,4%)
N/A	32 (33,0%)
Quimioterapia	
PEB	56 (57,7%)
EP	14 (14,4%)
TIP	1 (1,0%)
Ignorado	26 (26,8%)
Quimiossensibilidade	
Responsivo	62 (63,9%)
Refratário	6 (6,2%)
Ignorado	4 (4,1%)
N/A	25 (25,8%)

AJCC: American Joint Committee on Cancer

IGCCCG: *International Germ Cell Cancer Collaborative Group*

N/A: Não se aplica

A probabilidade de sobrevida global da coorte analisada foi de 91,5% no período de seguimento de 5 anos e 83,2% no período de seguimento de 10 anos, como apresentado na Figura 8.

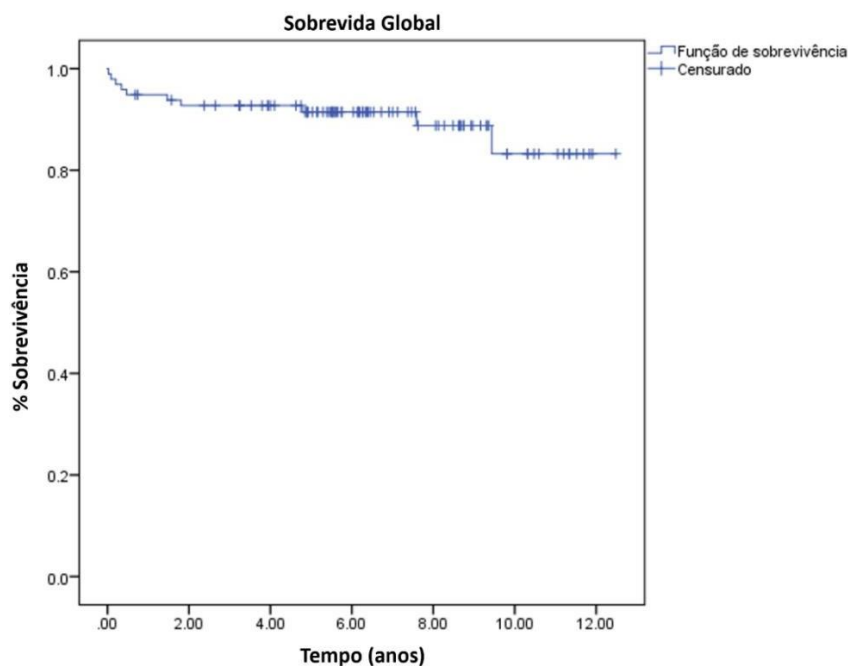
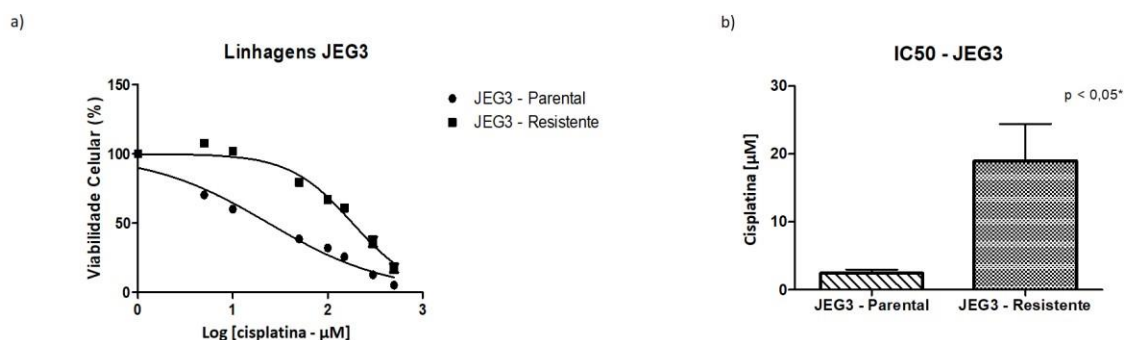


Figura 8 – Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida global de pacientes com TCGT.O tempo de sobrevivência é apresentado em anos.

6.2 Estabelecimento do modelo *in vitro* de resistência à cisplatina

A linhagem celular JEG3 foi mantida em cultura e exposta a tratamentos com doses crescentes de cisplatina por 9 meses, adquirindo um IC₅₀ significativamente maior ($p < 0,05$) de aproximadamente 8 vezes em relação à linhagem parental, verificada pelo ensaio de viabilidade celular. A linhagem parental apresentou um IC₅₀ igual a 2,45 μM (DP \pm 0,5), enquanto a linhagem resistente mostrou um valor de IC₅₀ igual a 18,98 μM (DP \pm 5,4) (Figuras 9a e 9b).



	IC50 Estimado	Desvio Padrão	Erro Padrão	Intervalo de Confiança (< 95%)	Intervalo de Confiança (> 95%)
JEG3-P	2,44	0,5	0,2	1,5	3,3
JEG3-R	18,98	5,4	2,7	10,3	27,6

Figura 9 – Resposta das linhagens JEG3 parental (JEG3-P) e JEG3 resistente (JEG3-R) ao tratamento com cisplatina, verificada pelo ensaio de viabilidade celular. a) Viabilidade celular das linhagens JEG3 parental e resistente em função do log da concentração de cisplatina. b) Determinação do IC₅₀ das linhagens JEG3 parental e resistente.

6.3 Análise de CNV para *KRAS*

Dos 97 casos incluídos no estudo, 51 casos foram factíveis de análise para variação do número de cópias do gene *KRAS*. Observou-se que 80,4% dos casos (41 casos) apresentaram o ganho de pelo menos uma cópia a mais do gene avaliado, com variação de 3 a 7 cópias de *KRAS*; enquanto nenhum caso apresentou perda de cópias do mesmo gene (Figura 10).

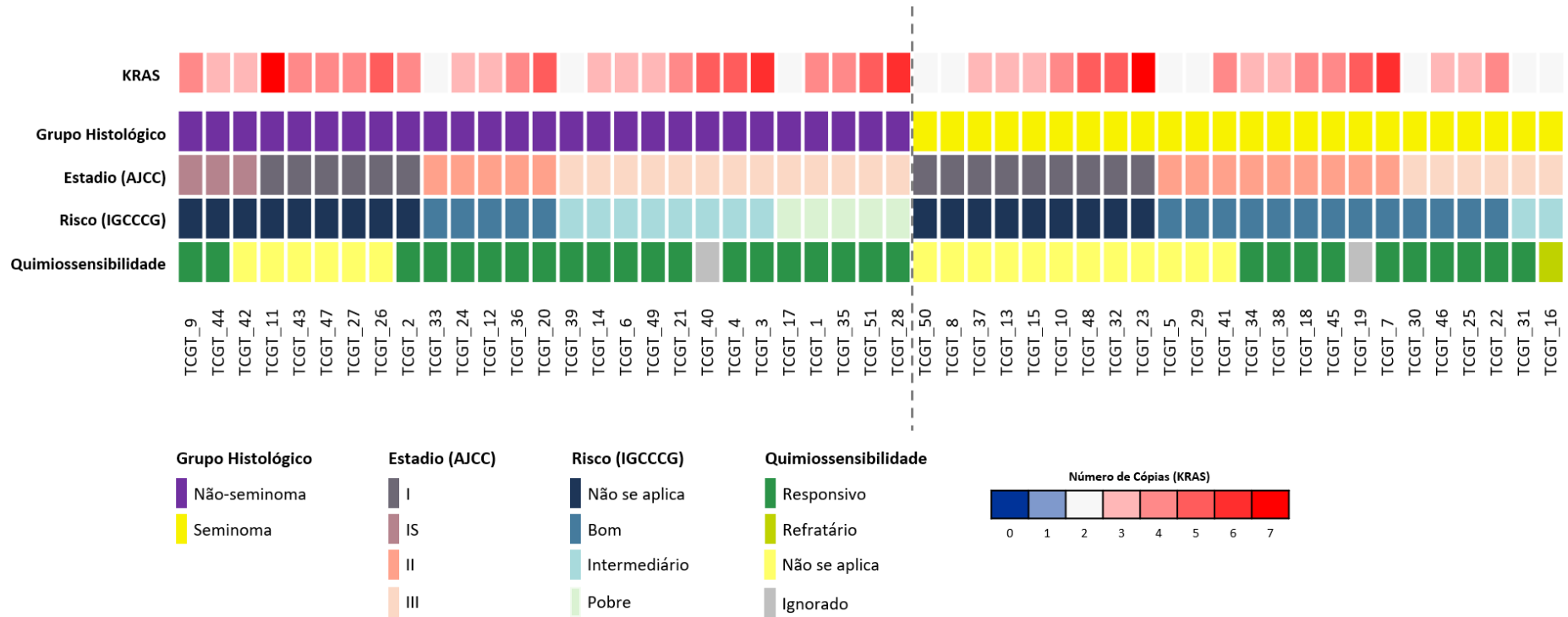


Figura 10 – Variação do número de cópias do gene *KRAS* comparados aos dados clínico-patológicos. Apenas TCGTs avaliados para a variação do número de cópias são apresentados (n = 51).

Os resultados obtidos foram comparados aos dados clínico-patológicos dos pacientes, como idade, grupo histológico, estadio (AJCC), risco (IGCCCG) e quimiossensibilidade ao tratamento à base de cisplatina por meio de uma análise univariada; no entanto, não foi observado por meio dessa análise, uma relação clara entre os grupos e os casos com variação no número de cópias de *KRAS* (Tabela 6).

Tabela 6 – Características clínico-patológicas dos pacientes com TCGT e resultados da variação no número de cópias do gene *KRAS*.

Variáveis	Parâmetros	n	Amplificação (<i>KRAS</i>)		p-valor
			SIM (%)	NÃO (%)	
Idade	< 30 anos	51	21 (41,2)	4 (7,8)	0,726
	≥ 30 anos		20 (39,2)	6 (11,8)	
Grupo Histológico	Não seminoma	51	24 (47,1)	3 (5,9)	0,160
	Seminoma		17 (33,3)	7 (13,7)	
Estadio (AJCC)	IS	51	3 (5,9)	0 (0,0)	0,861
	I		13 (25,5)	2 (3,9)	
	II		11 (21,6)	3 (5,9)	
	III		14 (27,5)	5 (9,8)	
Risco (IGCCCG)	Baixo	33	14 (42,5)	4 (12,1)	0,861
	Intermediário		7 (21,2)	3 (9,1)	
	Alto		4 (12,1)	1 (3,0)	
Quimiossensibilidade	Responsivo	31	25 (80,7)	5 (16,1)	0,194
	Refratário		0 (0,0)	1 (3,2)	

Embora não tenha sido observada uma diferença significativa entre os dados clínico-patológicos e o status de amplificação do gene *KRAS*, nota-se uma redução da sobrevida global da coorte analisada no período de 10 anos, entre os casos com aumento do número de cópias de *KRAS* e casos com número de cópias normal; visto que a probabilidade de sobrevida foi de 90% para os casos que não apresentaram amplificação e 81,5% para os casos com

amplificação do gene *KRAS* (Log-rank: $p = 0,048$), no período de seguimento de 10 anos (Figura 11).

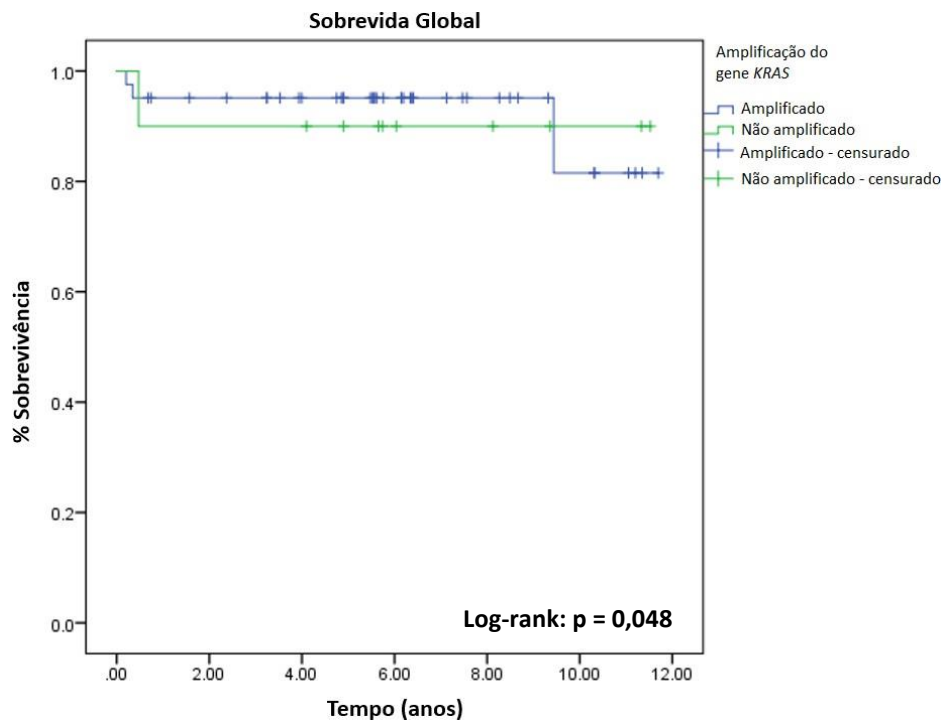


Figura 11 – Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida global de pacientes com TCGT de acordo com estadiamento e amplificação do gene *KRAS*. O tempo de sobrevivência é apresentado em anos; e os valores de p estão relacionados aos resultados do teste Log-rank.

6.4 Distribuição das variantes chamadas

Dos 97 casos incluídos no estudo, 65 casos foram factíveis de análise para identificação de variantes, utilizando o painel *Trusight Tumor 15*. Observou-se que 72,3% dos casos (47 casos) apresentaram pelo menos uma variante em um dos 15 genes testados, após a aplicação dos filtros de análise na plataforma *Varstation*[®]; e um total de 108 variantes em 12 dos 15 genes analisados foram identificadas. O número de variantes distintas para cada um dos 12 genes mutados, é apresentado na Figura 12.

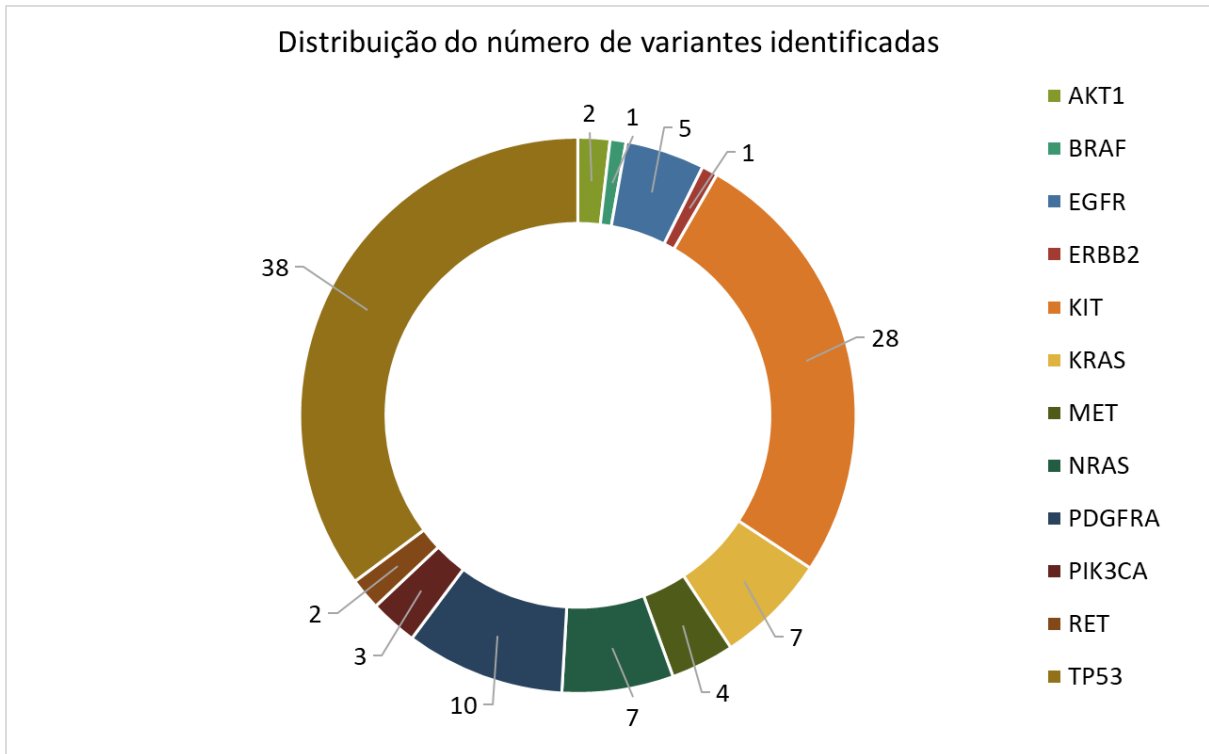


Figura 12 – Número de variantes chamadas em cada um dos 12 genes mutados.

Após uma curadoria manual e mais refinada das variantes chamadas, na qual foram consideradas apenas variantes conhecidas e/ou preditas como *driver*, observou-se que 40% dos casos (26 casos) apresentaram pelo menos uma variante conhecida e/ou predita como *driver*.

Nestes 26 casos, um total de 29 variantes foram confirmadas em 9 dos 15 genes avaliados pelo painel, entre as quais o gene mais comumente mutado foi o gene *TP53* (n= 12; 18.0%), seguido dos genes *KIT* (n= 6; 9.0%), *BRAF* (n= 3; 5.0%), *KRAS* (n= 2; 3.0%), *PIK3CA* (n= 2; 3.0%), *NRAS* (n= 1; 1.5%), *EGFR* (1; 1.5%), *PDGFRA* (n= 1; 1.5%) e *ERBB2* (1; 1.5%), como apresentado na Figura 13.

Nenhuma variante foi identificada nos genes *AKT1*, *RET*, *MET*, *FOXL2*, *GNAQ* e *GNA11*, bem como nenhuma variante conhecida ou predita como *driver* foi identificada nas linhagens NTERA-2R e JEG3R, cujo modelo de resistência à cisplatina foi estabelecido *in vitro*.

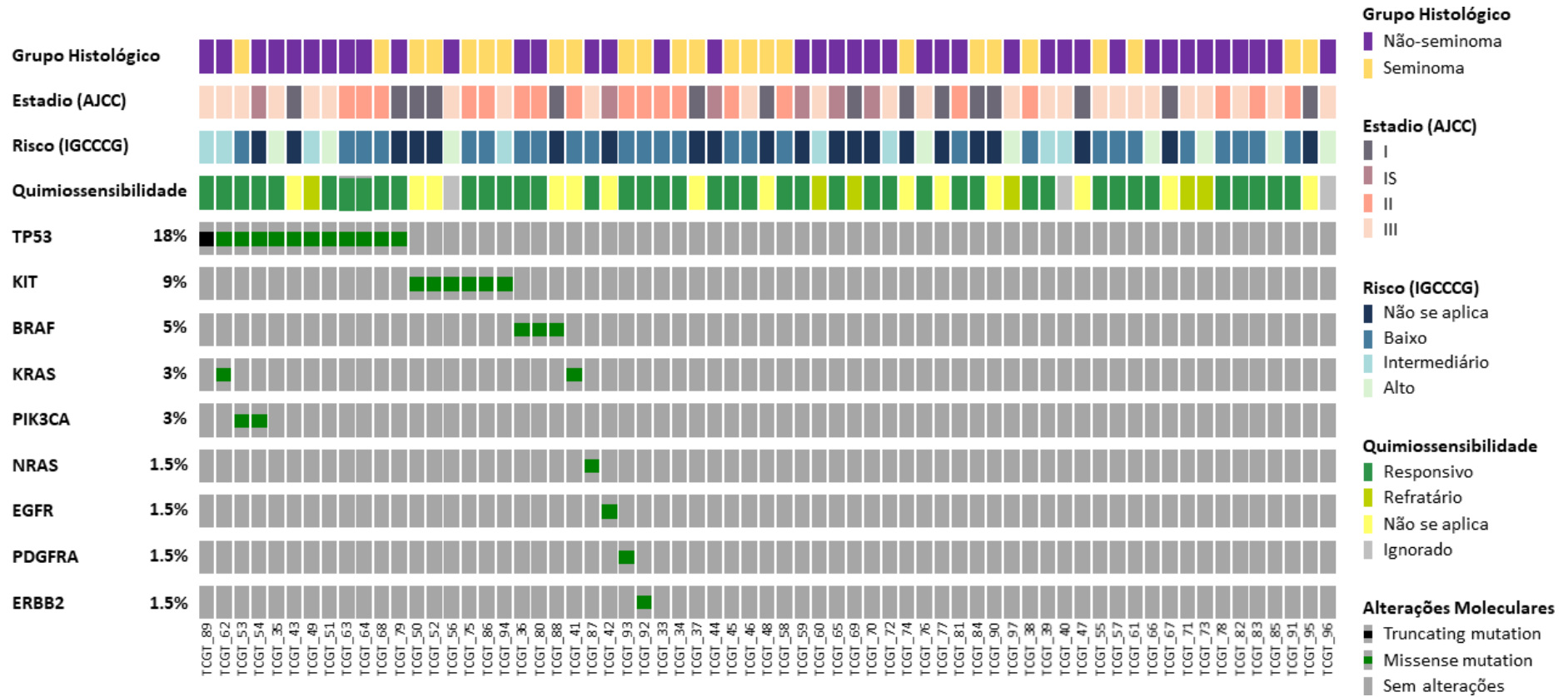


Figura 13 – Frequência de variantes conhecidas e previstas como *driver* nos 10 genes mutados.

A Figura 14 apresenta a distribuição das variantes conhecidas e previstas como *driver* identificadas em cada um dos 26 casos, mostrando que os mesmos apresentaram até quatro variantes distintas.

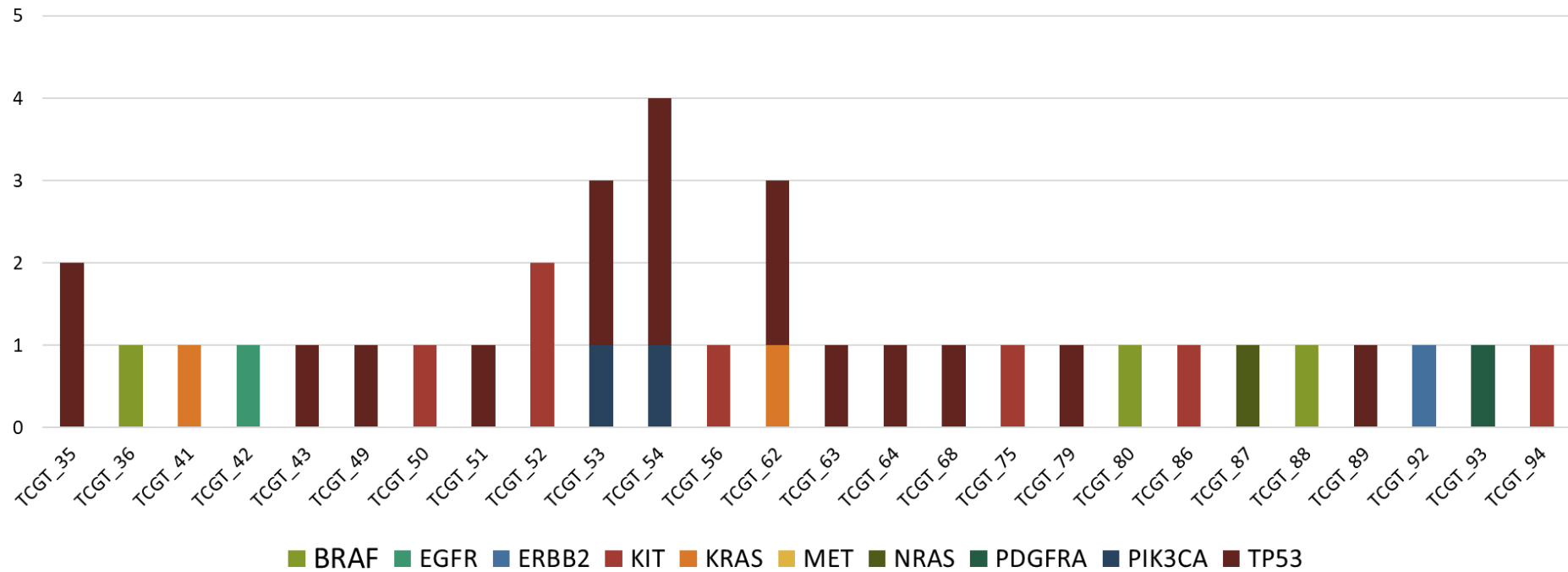


Figura 14 – Distribuição das variantes conhecidas e previstas como *driver*, por pacientes.

Informações importantes acerca das variantes encontradas e sua localização nos domínios de cada gene, são apresentadas nas Tabelas 7-15 e nos gráficos *lollipop* (Figuras 15-23), respectivamente.

Gene *ERBB2*

Tabela 7 – Variantes identificadas no gene *ERBB2*.

Paciente	Gene	Variante	Posição Genômica	Tipo	Consequência	Profundidade da variante	VAF (%)	Éxon	c.DNA	Proteína	Alelo referência	Alelo alterado	NM	Varstation	Clinvar	COSMIC	Varsome	Predição
TCGT_92	<i>ERBB2</i>	V842I	chr17:g.37881332	SNV	Missense	1469	0.096	24	c.2434G>A	p.(Val812Ile)	G	A	NM_001005862.2	VUS	Patogênica / Provavelmente patogênica	NI	NI	Conhecida

VUS: Variant of Uncertain Significance (Variante de Significado Incerto)

SNV: Single Nucleotide Variant (Variante de Nucleotídeo Único)

VAF: Variant allele frequency (Frequência Alélica da Variante)

NI: Não informado

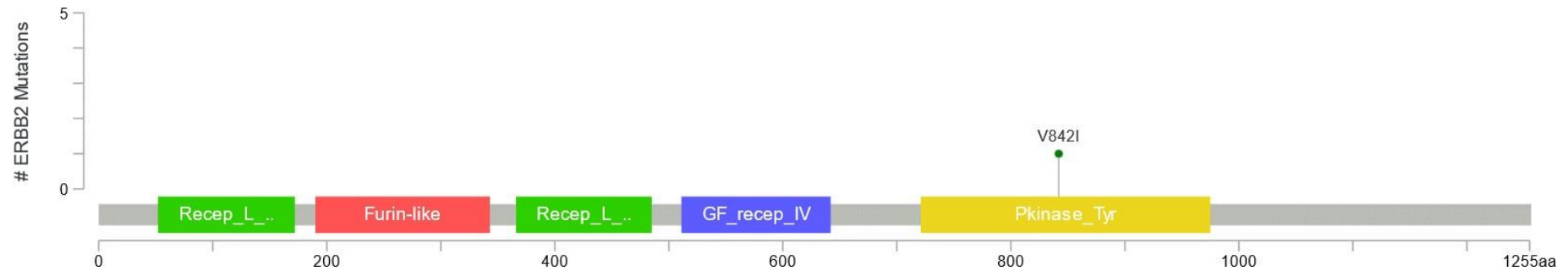


Figura 15 – Gráfico *lollipop* das variantes encontradas no gene *ERBB2*.

Gene *NRAS*

Tabela 8 – Variantes identificadas no gene *NRAS*.

Paciente	Gene	Variante	Posição Genômica	Tipo	Consequência	Profundidade da variante	VAF (%)	Éxon	c.DNA	Proteína	Alelo referência	Alelo alterado	NM	Varstation	Clinvar	COSMIC	Varsome	Predição
TCGT_87	<i>NRAS</i>	G60R	chr1:g.115256533	SNV	Missense	5897	0.038	3	c.178G>A	p.(Gly60Arg)	C	T	NM_002524.5	VUS	Provavelmente patogênica	NI	Patogênica	Conhecida

VUS: Variant of Uncertain Significance (Variante de Significado Incerto)

SNV: Single Nucleotide Variant (Variante de Nucleotídeo Único)

VAF: Variant allele frequency (Frequência Alélica da Variante)

NI: Não informado

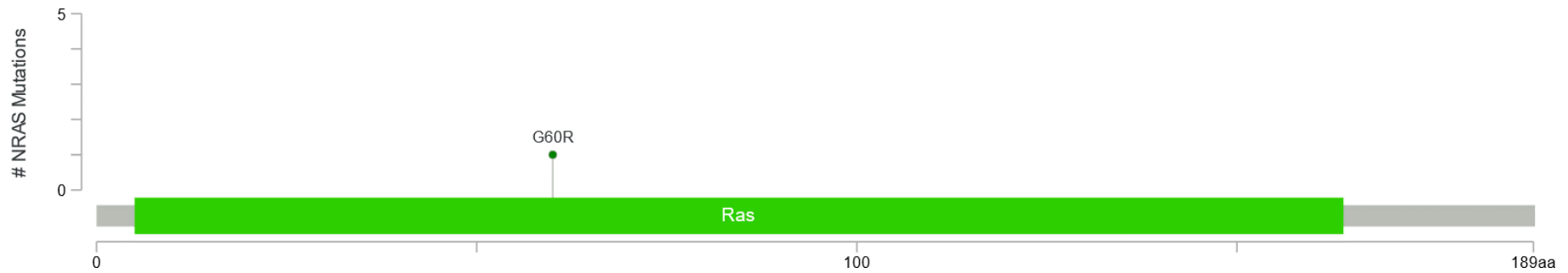


Figura 16 – Gráfico *lollipop* das variantes encontradas no gene *NRAS*.

Gene *PIK3CA*

Tabela 9 – Variantes identificadas no gene *PIK3CA*.

Paciente	Gene	Variante	Posição Genômica	Tipo	Consequência	Profundidade da variante	VAF (%)	Éxon	c.DNA	Proteína	Alelo referência	Alelo alterado	NM	Varstation	Clinvar	COSMIC	Varsome	Predição
TCGT_53	<i>PIK3CA</i>	H1047R	chr3:g.178952085	SNV	Missense	62799	0.340	21	c.3140A>G	p.(His1047Arg)	A	G	NM_006218.4	VUS	Patogênica	Patogênica	Patogênica	Conhecida
TCGT_54	<i>PIK3CA</i>	Q546H	chr3:g.178936096	SNV	Missense	12459	0.031	10	c.1638G>T	p.(Gln546His)	G	T	NM_006218.4	VUS	Provavelmente patogênica	Patogênica	Patogênica	Conhecida

VUS: Variant of Uncertain Significance (Variante de Significado Incerto)

SNV: Single Nucleotide Variant (Variante de Nucleotídeo Único)

VAF: Variant allele frequency (Frequência Alélica da Variante)

NI: Não informado

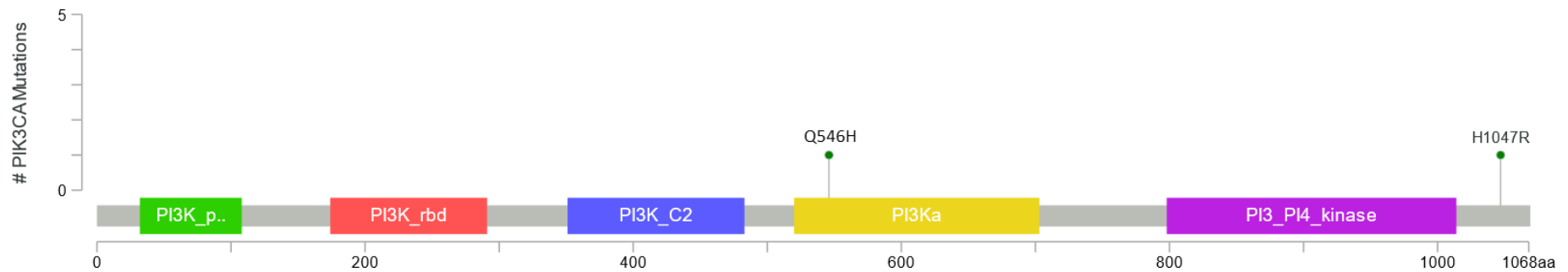


Figura 17 – Gráfico *lollipop* das variantes encontradas no gene *PIK3CA*.

Gene *KRAS*

Tabela 10 – Variantes identificadas no gene *KRAS*.

Paciente	Gene	Variante	Posição Genômica	Tipo	Consequência	Profundidade da variante	VOF (%)	Éxon	c.DNA	Proteína	Alelo referência	Alelo alterado	NM	Varstation	Clinvar	COSMIC	Varsome	Predição
TCGT_41	<i>KRAS</i>	G12D	chr12:g.25398284	SNV	Missense	6638	0.234	2	c.35G>A	p.(Gly12Asp)	C	T	NM_004985.5	VUS	Patogênica	Patogênica	NI	Conhecida
TCGT_62	<i>KRAS</i>	A146T	chr12:g.25378562	SNV	Missense	3860	0.060	4	c.436G>A	p.(Ala146Thr)	C	T	NM_033360.4	VUS	VUS	Patogênica	NI	Predita (Driver)

VUS: Variant of Uncertain Significance (Variante de Significado Incerto)

SNV: Single Nucleotide Variant (Variante de Nucleotídeo Único)

VOF: Variant allele frequency (Frequência Alélica da Variante)

NI: Não informado

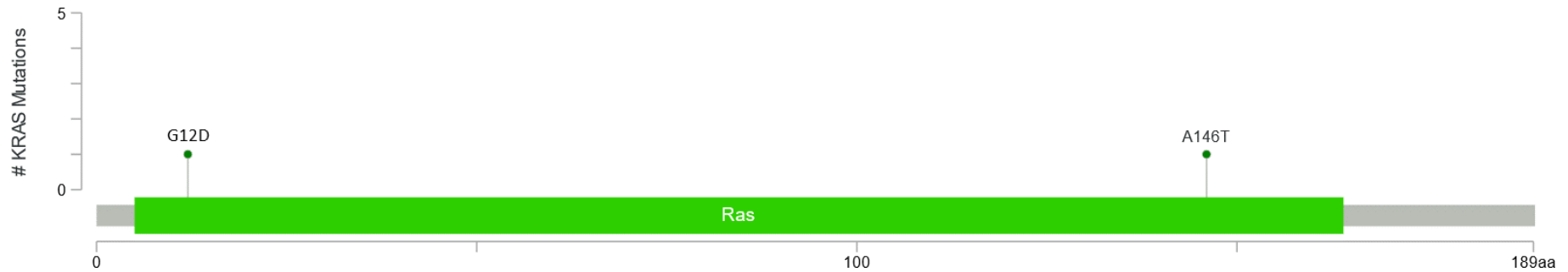


Figura 18 – Gráfico *lollipop* das variantes encontradas no gene *KRAS*.

Gene *PDGFRA*

Tabela 11 – Variantes identificadas no gene *PDGFRA*.

Paciente	Gene	Variante	Posição Genômica	Tipo	Consequência	Profundidade da variante	VAF (%)	Éxon	c.DNA	Proteína	Alelo referência	Alelo alterado	NM	Varstation	Clinvar	COSMIC	Varsome	Predição
TCGT_93	<i>PDGFRA</i>	S851L	chr4:g.55152120	SNV	Missense	7260	0.080	18	c.2552C>T	p.(Ser851Leu)	C	T	NM_006206.6	VUS	VUS	Patogênica	VUS	Predita (Driver)

VUS: Variant of Uncertain Significance (Variante de Significado Incerto)

SNV: Single Nucleotide Variant (Variante de Nucleotídeo Único)

VAF: Variant allele frequency (Frequência Alélica da Variante)

NI: Não informado

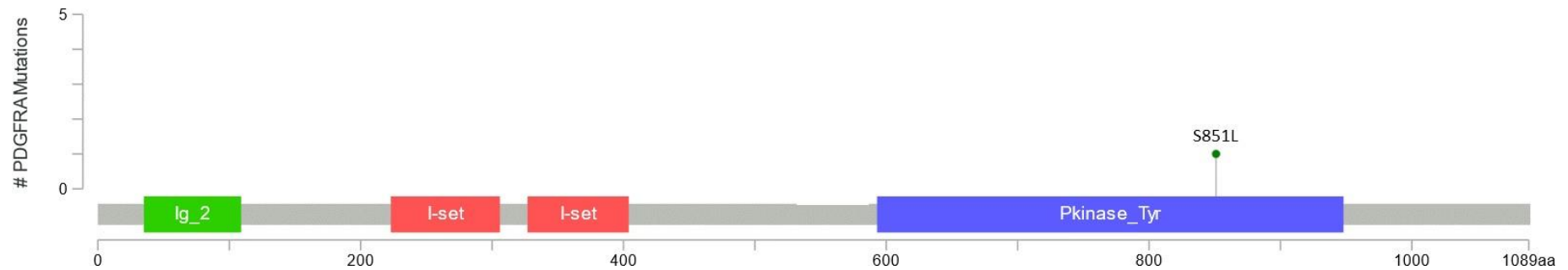


Figura 19 – Gráfico *lollipop* das variantes encontradas no gene *PDGFRA*.

Gene *BRAF*

Tabela 12 – Variantes identificadas no gene *BRAF*.

Paciente	Gene	Variante	Posição Genômica	Tipo	Consequência	Profundidade da variante	VAF (%)	Éxon	c.DNA	Proteína	Alelo referência	Alelo alterado	NM	Varstation	Clinvar	COSMIC	Varsome	Predição
TCGT_36	<i>BRAF</i>	T599I	chr7:g.140453139	SNV	Missense	20947	0.040	15	c.1796C>T	p.(Thr599Ile)	G	A	NM_004333.6	VUS	Patogênica	Patogênica	Patogênica	Conhecida
TCGT_80	<i>BRAF</i>	T599I	chr7:g.140453139	SNV	Missense	20947	0.038	15	c.1796C>T	p.(Thr599Ile)	G	A	NM_004333.6	VUS	Patogênica	Patogênica	Patogênica	Conhecida
TCGT_88	<i>BRAF</i>	T599I	chr7:g.140453139	SNV	Missense	20947	0.053	15	c.1796C>T	p.(Thr599Ile)	G	A	NM_004333.6	VUS	Patogênica	Patogênica	Patogênica	Conhecida

VUS: Variant of Uncertain Significance (Variante de Significado Incerto)

SNV: Single Nucleotide Variant (Variante de Nucleotídeo Único)

VAF: Variant allele frequency (Frequência Alélica da Variante)

NI: Não informado

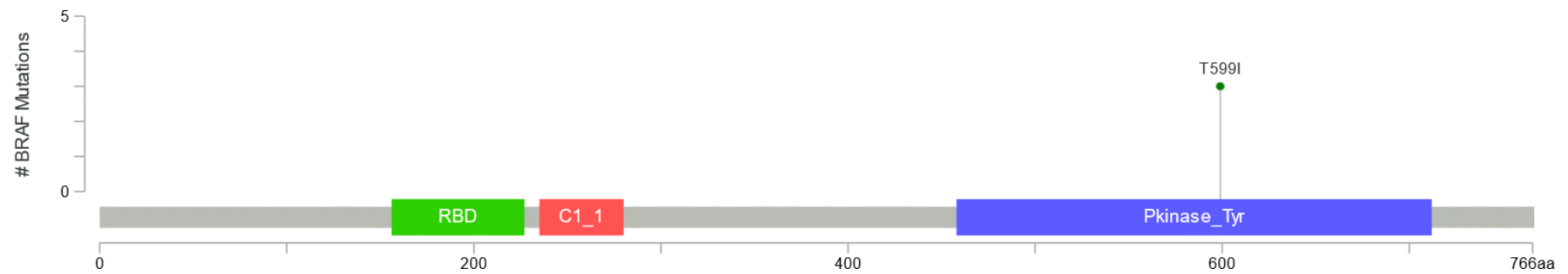


Figura 20 – Gráfico *lollipop* das variantes encontradas no gene *BRAF*.

Gene *EGFR*

Tabela 13 – Variantes identificadas no gene *EGFR*.

Paciente	Gene	Variante	Posição Genômica	Tipo	Consequência	Profundidade da variante	VAF (%)	Éxon	c.DNA	Proteína	Alelo referência	Alelo alterado	NM	Varstation	Clinvar	COSMIC	Varsome	Predição
TCGT_42	<i>EGFR</i>	T790M	chr7:g.55249071	SNV	Missense	19371	0.031	20	c.2369C>T	p.(Thr790MET)	C	T	NM_005228.5	VUS	Resposta à droga	Patogênica	Patogênica	Conhecida

VUS: Variant of Uncertain Significance (Variante de Significado Incerto)

SNV: Single Nucleotide Variant (Variante de Nucleotídeo Único)

VAF: Variant allele frequency (Frequência Alélica da Variante)

NI: Não informado

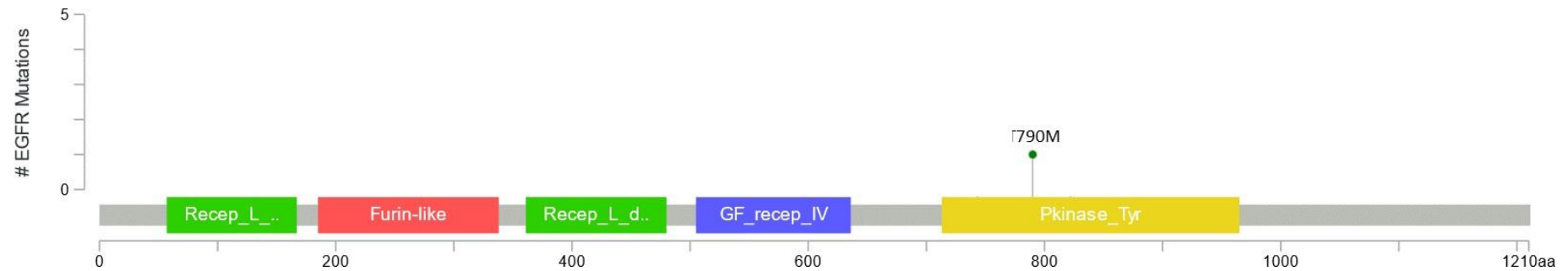


Figura 21 – Gráfico *lollipop* das variantes encontradas no gene *EGFR*.

Gene *KIT*

Tabela 14 – Variantes identificadas no gene *KIT*.

Paciente	Gene	Variante	Posição Genômica	Tipo	Consequência	Profundidade da variante	VAF (%)	Éxon	c.DNA	Proteína	Alelo referência	Alelo alterado	NM	Varstation	Clinvar	COSMIC	Varsome	Predição
TCGT_50	<i>KIT</i>	N655K	chr4:g.55594262	SNV	Missense	4523	0.138	13	c.1965T>A	p.(Asn655Lys)	T	A	NM_000222.2	VUS	Provavelmente patogênica	Patogênica	Patogênica	Conhecida
TCGT_52	<i>KIT</i>	L576P	chr4:g.55593661	SNV	Missense	7866	0.067	11	c.1727T>C	p.(Leu576Pro)	T	C	NM_000222.2	VUS	Provavelmente patogênica	Patogênica	Provavelmente patogênica	Conhecida
TCGT_52	<i>KIT</i>	N822K	chr4:g.55599340	SNV	Missense	17166	0.521	17	c.2466T>G	p.(Asn822Lys)	T	G	NM_000222.2	VUS	Patogênica	Patogênica	Patogênica	Conhecida
TCGT_56	<i>KIT</i>	N655K	chr4:g.55594262	SNV	Missense	2104	0.697	13	c.1965T>G	p.(Asn655Lys)	T	G	NM_000222.2	VUS	Provavelmente patogênica	Patogênica	Patogênica	Conhecida
TCGT_75	<i>KIT</i>	N655K	chr4:g.55594262	SNV	Missense	2217	0.570	13	c.1965T>G	p.(Asn655Lys)	T	G	NM_000222.2	VUS	Provavelmente patogênica	Patogênica	Patogênica	Conhecida
TCGT_86	<i>KIT</i>	D820Y	chr4:g.55599332	SNV	Missense	6008	0.498	17	c.2458G>T	p.(Asp820Tyr)	G	T	NM_000222.2	VUS	Patogênica	Patogênica	NI	Predita (Driver)
TCGT_94	<i>KIT</i>	L576P	chr4:g.55593661	SNV	Missense	614	0.569	11	c.1727T>C	p.(Leu576Pro)	T	C	NM_000222.2	VUS	Provavelmente patogênica	Patogênica	Provavelmente patogênica	Conhecida

VUS: Variant of Uncertain Significance (Variante de Significado Incerto)

SNV: Single Nucleotide Variant (Variante de Nucleotídeo Único)

VAF: Variant allele frequency (Frequência Alélica da Variante)

NI: Não informado

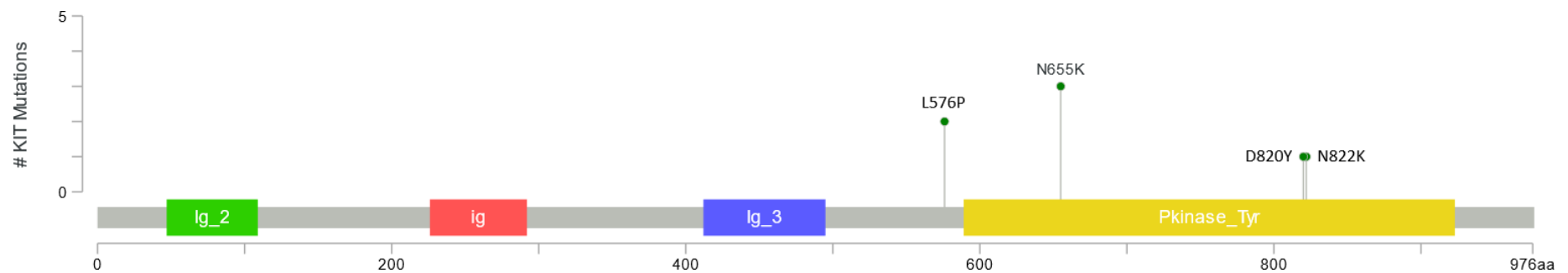


Figura 22 – Gráfico *lollipop* das variantes encontradas no gene *KIT*.

Gene *TP53*Tabela 15 – Variantes identificadas no gene *TP53*.

Paciente	Gene	Variante	Posição Genômica	Tipo	Consequência	Profundidade da variante	VAF (%)	Éxon	c.DNA	Proteína	Alelo referência	Alelo alterado	NM	Varstation	Clinvar	COSMIC	Varsome	Predição
TCGT_54	<i>TP53</i>	R337C	chr17:g.7574018	SNV	Missense	15838	0.046	10	c.1009C>T	p.(Arg337Cys)	G	A	NM_000546.5	Provavelmente patogênica	Patogênica / Provavelmente patogênica	Patogênica	Patogênica	Conhecida
TCGT_62	<i>TP53</i>	R337C	chr17:g.7574018	SNV	Missense	14996	0.031	10	c.1009C>T	p.(Arg337Cys)	G	A	NM_000546.5	Provavelmente patogênica	Patogênica / Provavelmente patogênica	Patogênica	Patogênica	Conhecida
TCGT_53	<i>TP53</i>	R337C	chr17:g.7574018	SNV	Missense	14955	0.036	10	c.1009C>T	p.(Arg337Cys)	G	A	NM_000546.5	Provavelmente patogênica	Patogênica / Provavelmente patogênica	Patogênica	Patogênica	Conhecida
TCGT_35	<i>TP53</i>	R273C	chr17:g.7577121	SNV	Missense	2436	0.060	8	c.817C>T	p.(Arg273Cys)	G	A	NM_000546.5	VUS	Patogênica / Provavelmente patogênica	Patogênica	NI	Conhecida
TCGT_89	<i>TP53</i>	R196*	chr17:g.7578263	SNV	Nonsense	4306	0.059	6	c.586C>T	p.(Arg196Ter)	G	A	NM_000546.5	Patogênica	Patogênica	Patogênica	NI	Conhecida
TCGT_62	<i>TP53</i>	R181H	chr17:g.7578388	SNV	Missense	10864	0.030	5	c.542G>A	p.(Arg181His)	C	T	NM_000546.5	VUS	Patogênica / Provavelmente patogênica	Patogênica	NI	Conhecida
TCGT_54	<i>TP53</i>	R290C	chr17:g.7577070	SNV	Missense	5409	0.049	8	c.868C>T	p.(Arg290Cys)	G	A	NM_000546.5	VUS	Provavelmente benigna / VUS	Patogênica	Patogênica	Predita (Driver)
TCGT_43	<i>TP53</i>	R290C	chr17:g.7577070	SNV	Missense	7844	0.051	8	c.868C>T	p.(Arg290Cys)	G	A	NM_000546.5	VUS	Provavelmente benigna / VUS	Patogênica	Patogênica	Predita (Driver)
TCGT_53	<i>TP53</i>	R290C	chr17:g.7577070	SNV	Missense	3522	0.038	8	c.868C>T	p.(Arg290Cys)	G	A	NM_000546.5	VUS	Provavelmente benigna / VUS	Patogênica	Patogênica	Predita (Driver)
TCGT_54	<i>TP53</i>	R248Q	chr17:g.7577538	SNV	Missense	15664	0.083	7	c.743G>A	p.(Arg248Gln)	C	T	NM_000546.5	VUS	Patogênica	Patogênica	NI	Predita (Driver)
TCGT_68	<i>TP53</i>	R248Q	chr17:g.7577538	SNV	Missense	16437	0.043	7	c.743G>A	p.(Arg248Gln)	C	T	NM_000546.5	VUS	Patogênica	Patogênica	NI	Predita (Driver)
TCGT_79	<i>TP53</i>	R248Q	chr17:g.7577538	SNV	Missense	14998	0.042	7	c.743G>A	p.(Arg248Gln)	C	T	NM_000546.5	VUS	Patogênica	Patogênica	NI	Predita (Driver)
TCGT_51	<i>TP53</i>	R248Q	chr17:g.7577538	SNV	Missense	16800	0.048	7	c.743G>A	p.(Arg248Gln)	C	T	NM_000546.5	VUS	Patogênica	Patogênica	NI	Predita (Driver)

TCGT_64	TP53	G245S	chr17:g.7577548	SNV	Missense	21177	0.035	7	c.733G>A	p.(Gly245Ser)	C	T	NM_000546.5	VUS	Patogênica	Patogênica	NI	Predita (Driver)
TCGT_63	TP53	G245S	chr17:g.7577548	SNV	Missense	17981	0.035	7	c.733G>A	p.(Gly245Ser)	C	T	NM_000546.5	VUS	Patogênica	Patogênica	NI	Predita (Driver)
TCGT_35	TP53	R282W	chr17:g.7577094	SNV	Missense	2436	0.098	8	c.844C>T	p.(Arg282Trp)	G	A	NM_000546.5	Provavelmente patogênica	Patogênica / Provavelmente patogênica	Patogênica	NI	Predita (Driver)
TCGT_49	TP53	C277Y	chr17:g.7577108	SNV	Missense	800	0.114	8	c.830G>A	p.(Cys277Tyr)	C	T	NM_000546.5	VUS	Provavelmente patogênica / VUS	Patogênica	NI	Predita (Driver)

VUS: Variant of Uncertain Significance (Variante de Significado Incerto)

SNV: Single Nucleotide Variant (Variante de Nucleotídeo Único)

VAF: Variant allele frequency (Frequência Alélica da Variante)

NI: Não informado

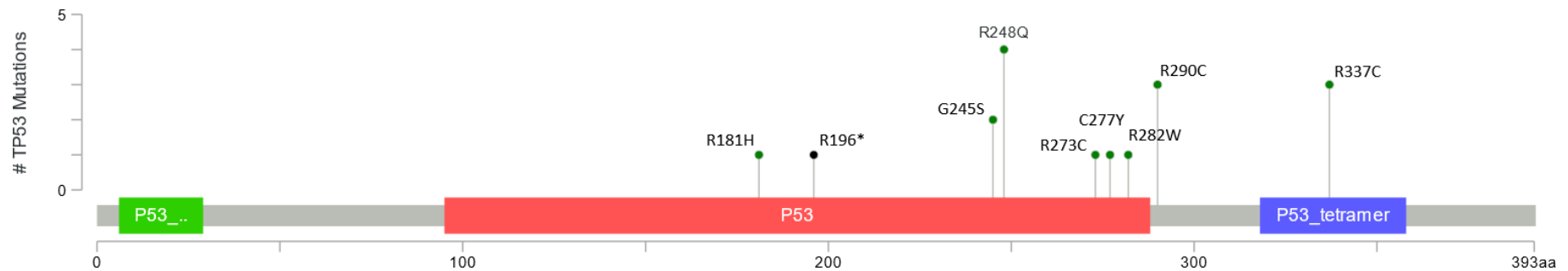


Figura 23 – Gráfico *lollipop* das variantes encontradas no gene *TP53*.

Os casos que apresentaram variantes conhecidas e preditas como *driver*, bem como os casos *wide type* (WT), foram correlacionados aos dados clínico-patológicos por meio de uma análise univariada (Tabela 16). Contudo, a idade, grupo histológico, estadió, risco, quimiossensibilidade e amplificação de *KRAS* não foram associados à nenhuma das mutações identificadas em nosso trabalho.

Tabela 16 – Análise univariada da associação entre características clínico-patológicas e variantes de interesse.

Variáveis	Parâmetros	n	KIT				TP53			
			Conhecidas (%)	Preditas (<i>driver</i>) (%)	WT (%)	p-valor	Conhecidas (%)	Preditas (<i>Driver</i>) (%)	WT (%)	p-valor
Idade	< 30 anos	37	9,2	1,5	46,2	0,249	6,2	7,7	43,1	0,393
	≥ 30 anos	28	10,8	4,6	27,7		1,5	3,1	38,5	
Grupo Histológico	Não seminoma	25	7,7	3,1	50,8	0,101	7,7	6,2	47,7	0,230
	Seminoma	40	12,3	3,1	23,1		0,0	4,6	33,8	
Estadio (AJCC)	IS	6	1,5	0,0	7,7	0,876	1,5	0,0	0,0	0,314
	I	15	7,7	1,5	13,8		0,0	1,5	21,5	
	II	19	4,6	1,5	23,1		0,0	4,6	24,6	
	III	25	6,2	3,1	29,2		6,2	4,6	27,7	
Risco (IGCCCG)	Bom	27	9,1	2,3	50,0	0,633	0,0	9,1	52,3	0,063
	Intermediário	8	4,5	2,3	11,4		4,5	2,3	11,4	
	Pobre	9	2,3	2,3	15,9		4,5	2,3	13,6	
Quimiossensibilidade	Responsivo	43	14,6	8,3	66,7	0,730	10,4	10,4	68,8	0,745
	Refratário	5	0,0	0,0	10,4		0,0	2,1	8,3	
Amplificação <i>KRAS</i>	Amplificado	16	21,1	5,3	57,9	1,000	10,5	10,5	63,2	1,000
	Não amplificado	3	5,3	0,0	10,5		0,0	0,0	15,8	

Continuação Tabela 16

Variáveis	Parâmetros	n	PDGFRA				KRAS			
			Conhecidas (%)	Preditas (<i>driver</i>) (%)	WT (%)	p-valor	Conhecidas (%)	Preditas (<i>Driver</i>) (%)	WT (%)	p-valor
Idade	< 30 anos	37	3,1	1,5	52,3	0,822	0,0	0,0	56,9	0,075
	≥ 30 anos	28	4,6	1,5	36,9		1,5	3,1	38,5	
Grupo Histológico	Não seminoma	25	4,6	0,0	56,9	0,270	0,0	1,5	60,0	0,476
	Seminoma	40	3,1	3,1	32,3		1,5	1,5	35,4	
Estadio (AJCC)	IS	6	0,0	0,0	9,2	0,424	0,0	0,0	9,2	0,844
	I	15	3,1	1,5	18,5		0,0	0,0	23,1	
	II	19	0,0	1,5	27,7		1,5	1,5	26,2	
	III	25	4,6	0,0	33,8		0,0	1,5	36,9	
Risco (IGCCCG)	Bom	27	4,5	2,3	54,5	0,855	2,3	2,3	56,8	0,620
	Intermediário	8	2,3	0,0	15,9		0,0	2,3	15,9	
	Pobre	9	0,0	0,0	20,5		0,0	0,0	20,5	
Quimiossensibilidade	Responsivo	43	8,3	2,1	79,2	1,000	0,0	4,2	85,4	1,000
	Refratário	5	0,0	0,0	10,4		0,0	0,0	10,4	
Amplificação KRAS	Amplificado	16	5,3	0,0	78,9	1,000	5,3	0,0	78,9	1,000
	Não amplificado	3	0,0	0,0	15,8		5,3	0,0	15,8	

Continuação Tabela 16

Variáveis	Parâmetros	n	NRAS				EGFR			
			Conhecidas (%)	Preditas (<i>driver</i>) (%)	WT (%)	p-valor	Conhecidas (%)	Preditas (<i>Driver</i>) (%)	WT (%)	p-valor
Idade	< 30 anos	37	1,5	0,0	55,4	0,573	0,0	3,1	53,8	0,759
	≥ 30 anos	28	3,1	0,0	40,0		1,5	1,5	40,0	
Grupo Histológico	Não seminoma	25	1,5	0,0	60,0	0,554	1,5	3,1	56,9	1,000
	Seminoma	40	3,1	0,0	35,4		0,0	1,5	36,9	
Estadio (AJCC)	IS	6	0,0	0,0	9,2	1,000	1,5	0,0	7,7	0,355
	I	15	1,5	0,0	21,5		0,0	1,5	21,5	
	II	19	1,5	0,0	27,7		0,0	1,5	27,7	
	III	25	1,5	0,0	36,9		0,0	1,5	36,9	
Risco (IGCCCG)	Bom	27	4,5	0,0	56,8	1,000	0,0	2,3	59,1	0,372
	Intermediário	8	0,0	0,0	18,2		0,0	2,3	15,9	
	Pobre	9	0,0	0,0	20,5		0,0	0,0	20,5	
Quimiossensibilidade	Responsivo	43	4,2	0,0	85,4	1,000	0,0	4,2	85,4	1,000
	Refratário	5	0,0	0,0	10,4		0,0	0,0	10,4	
Amplificação KRAS	Amplificado	16	0,0	0,0	84,2	NA*	5,3	5,3	73,7	1,000
	Não amplificado	3	0,0	0,0	15,8		0,0	0,0	15,8	

Continuação Tabela 16

Variáveis	Parâmetros	n	MET				PIK3CA			
			Conhecidas (%)	Preditas (<i>driver</i>) (%)	WT (%)	p-valor	Conhecidas (%)	Preditas (<i>Driver</i>) (%)	WT (%)	p-valor
Idade	< 30 anos	37	1,5	0,0	55,4	0,680	1,5	0,0	55,4	1,000
	≥ 30 anos	28	0,0	1,5	41,5		1,5	0,0	41,5	
Grupo Histológico	Não seminoma	25	1,5	0,0	60,0	0,625	1,5	0,0	60,0	1,000
	Seminoma	40	0,0	1,5	36,9		1,5	0,0	36,9	
Estadio (AJCC)	IS	6	0,0	0,0	9,2	0,627	1,5	0,0	7,7	0,228
	I	15	0,0	1,5	21,5		0,0	0,0	23,1	
	II	19	0,0	0,0	29,2		0,0	0,0	29,2	
	III	25	1,5	0,0	36,9		1,5	0,0	36,9	
Risco (IGCCCG)	Bom	27	0,0	0,0	61,4	0,182	2,3	0,0	59,1	1,000
	Intermediário	8	2,3	0,0	15,9		0,0	0,0	18,2	
	Pobre	9	0,0	0,0	20,5		0,0	0,0	20,5	
Quimiossensibilidade	Responsivo	43	2,1	0,0	87,5	1,000	4,2	0,0	85,4	1,000
	Refratário	5	0,0	0,0	10,4		0,0	0,0	10,4	
Amplificação <i>KRAS</i>	Amplificado	16	0,0	0,0	84,2	NA*	0,0	0,0	84,2	NA*
	Não amplificado	3	0,0	0,0	15,8		0,0	0,0	15,8	

Continuação Tabela 16

Variáveis	Parâmetros	n	BRAF				ERBB2			
			Conhecidas (%)	Preditas (<i>driver</i>) (%)	WT (%)	p-valor	Conhecidas (%)	Preditas (<i>Driver</i>) (%)	WT (%)	p-valor
Idade	< 30 anos	37	3,1	0,0	53,8	1,000	0,0	0,0	56,9	0,431
	≥ 30 anos	28	1,5	0,0	41,5		0,0	1,5	41,5	
Grupo Histológico	Não seminoma	25	3,1	0,0	58,5	1,000	0,0	0,0	61,5	0,385
	Seminoma	40	1,5	0,0	36,9		0,0	1,5	36,9	
Estadio (AJCC)	IS	6	0,0	0,0	9,2	0,380	0,0	0,0	9,2	0,615
	I	15	1,5	0,0	21,5		0,0	0,0	23,1	
	II	19	3,1	0,0	26,2		0,0	1,5	27,7	
	III	25	0,0	0,0	38,5		0,0	0,0	38,5	
Risco (IGCCCG)	Bom	27	4,5	0,0	56,8	1,000	0,0	2,3	59,1	1,000
	Intermediário	8	0,0	0,0	18,2		0,0	0,0	18,2	
	Pobre	9	0,0	0,0	20,5		0,0	0,0	20,5	
Quimiossensibilidade	Responsivo	43	4,2	0,0	85,4	1,000	0,0	2,1	87,5	1,000
	Refratário	5	0,0	0,0	10,4		0,0	0,0	10,4	
Amplificação KRAS	Amplificado	16	5,3	0,0	78,9	1,000	0,0	0,0	84,2	NA*
	Não amplificado	3	0,0	0,0	15,8		0,0	0,0	15,8	

Os pacientes diagnosticados com TCGT em estadio III apresentaram uma sobrevida global mais baixa, quando comparado aos casos em estadio IS, I e II, apresentando diferença estatística significativa (Log-rank: $p < 0,05$). Embora a diferença significativa não tenha sido observada para o grupo histológico (Log-rank: $p = 0,238$) e o risco IGCCCG (Log-rank: $p = 0,096$), nota-se uma tendência de pior sobrevida global para os casos de não seminoma e risco intermediário e pobre; e os casos resistentes à cisplatina apresentaram uma sobrevida global de 33,3% no período de seguimento de 5 anos e nenhum dos casos resistentes alcançou uma sobrevida de 10 anos (Figura 25). Quando a sobrevida foi associada aos genes mutados, diferenças estatísticas significantes não foram observadas (Tabela 18 e Figura 26).

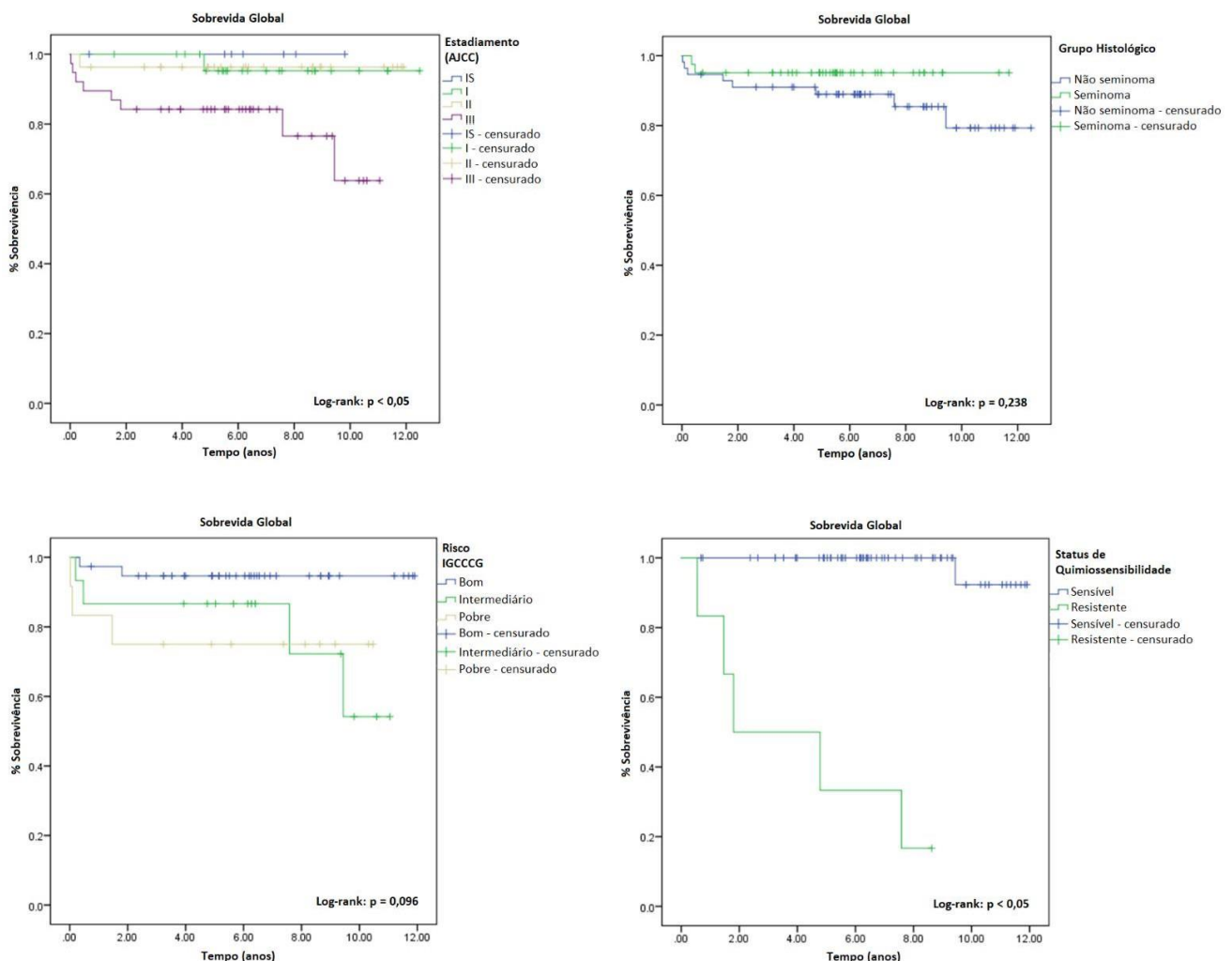


Figura 24 – Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida global de pacientes com TCGT de acordo com estadiamento AJCC, grupo histológico, risco IGCCCG e status de quimiossensibilidade. O tempo de sobrevivência é apresentado em anos; e os valores de p estão relacionados aos resultados do teste Log-rank.

Tabela 17 – Análise de associação entre sobrevida global de pacientes com TCGT e o status de mutação de cada gene.

Genes	Parâmetros	n	Sobrevida Global (2 anos) %	Sobrevida Global (5 anos) %	p-valor
KIT	Mutado	6	96,3	96,3	0,148
	WT	59	89,3	86,2	
TP53	Mutado	12	96,2	91,8	0,924
	WT	53	89,6	89,6	
PDGFRA	Mutado	1	100	91,7	0,673
	WT	64	90,2	90,2	
KRAS	Mutado	2	100	100	0,244
	WT	63	90,9	88,7	
NRAS	Mutado	1	100	100	0,412
	WT	64	91,4	89,3	
EGFR	Mutado	1	100	100	0,420
	WT	64	91,5	89,4	
PIK3CA	Mutado	2	100	100	0,536
	WT	63	91,8	89,9	
BRAF	Mutado	3	100	100	0,524
	WT	62	91,8	89,8	
ERBB2	Mutado	1	100	100	0,749
	WT	64	92,1	90,2	

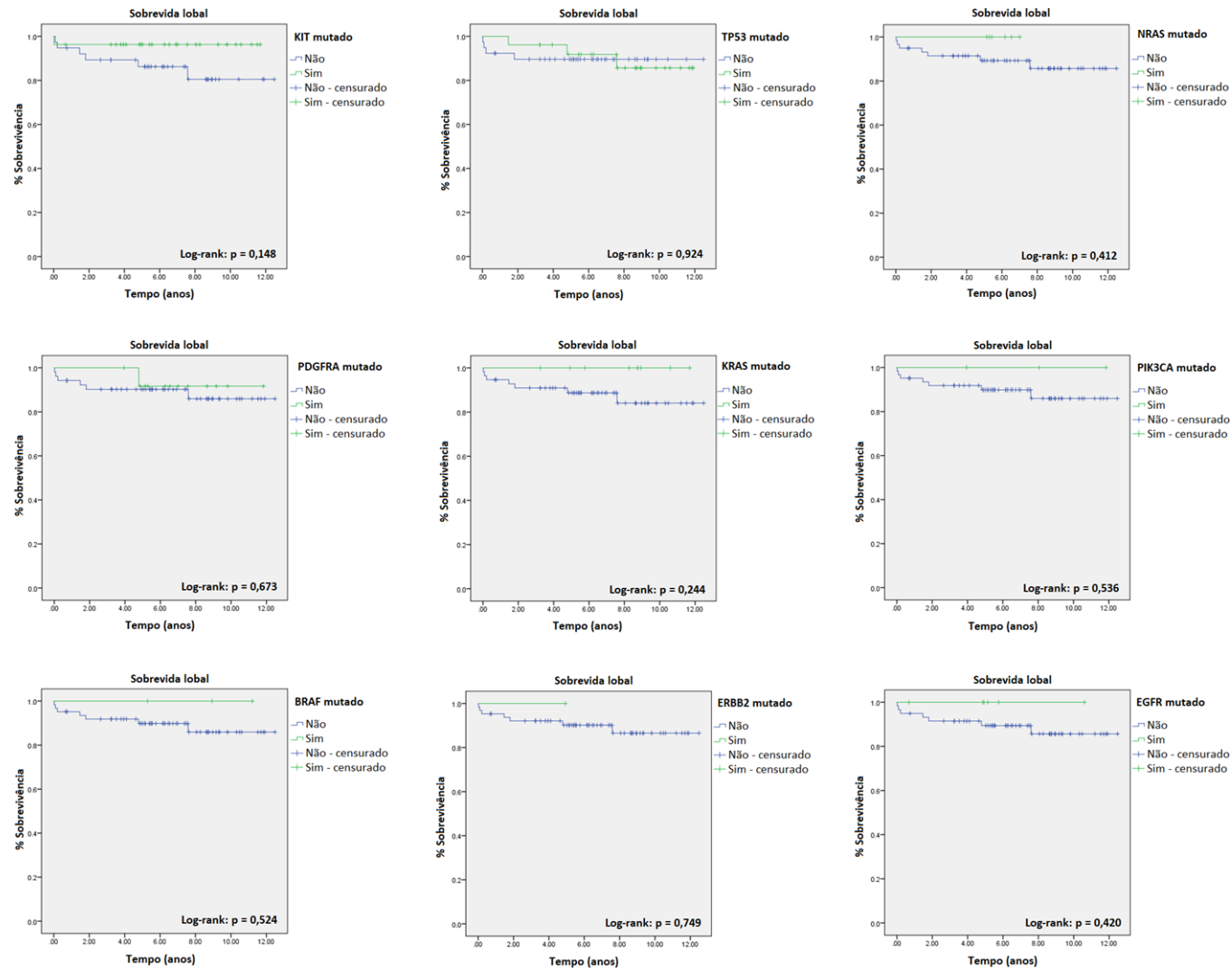


Figura 25 – Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida global de pacientes com TCGT para cada gene mutado. O tempo de sobrevivência é apresentado em anos; e os valores de p estão relacionados aos resultados do teste Log-rank.

7 DISCUSSÃO

Em nosso trabalho, reunimos uma coorte de 97 pacientes adultos jovens diagnosticados com TCGT, seguramente uma expressiva série de casos brasileiros, para os quais foi realizado uma avaliação mutacional dos genes comumente mutados em tumores sólidos, como também, a análise da variação do número de cópias do gene *KRAS*.

Observamos que, quase metade dos casos avaliados eram seminomas e a outra metade não seminomas, diagnosticados em torno de 32 anos de idade; o que condiz com a prática clínica e com a literatura atual^{34,92,93}. Nossos dados corroboram com os resultados descritos por Lobo et al.⁹⁴, nos quais os tumores mistos compuseram a grande maioria da nossa coorte, entre os casos de não seminomas. Ainda, foi observado que a refratariedade à quimioterapia a base de platina, regime quimioterápico de primeira linha para TCGT, ocorre em uma minoria desses pacientes com conseqüente progressão da doença e diminuição da sobrevida em um período de 10 anos^{34, 46, 47, 95, 96}.

A estratégia de tratamento, utilizando doses incrementais da droga, se assemelha à utilizada por Bakardjieva-Mihaylova e colaboradores⁴⁵ que estabeleceram um modelo de resistência para a linhagem NCCIT, mas não para a linhagem Tera-2. Resultados divergentes com linhagens do mesmo subtipo histológico, nos fazem acreditar que a quimiossensibilidade possa estar relacionada não só às características embrionárias do tumor, mas também ao seu processo de maturação, desenvolvimento e ao microambiente em que se encontram.

Em nossa série de casos, o aumento do número de cópias do gene *KRAS* não foi associado significativamente com nenhum dos dados clínico-patológicos, embora os não seminomas tenham apresentado uma maior taxa de amplificação no número de cópias deste gene. O ganho do isocromossomo 12p pode resultar na super expressão de genes localizados na região 12p11.2 – p12.1 do cromossomo 12, especialmente em não seminomas. Estudos relatam que a amplificação do gene *KRAS*, localizado nessa região, está correlacionada com sua superexpressão, que por sua vez está associada ao desenvolvimento dos TCGTs^{58,89}. Os achados são ainda controversos, dado que Loveday et al.⁵⁹ demonstraram que o número de cópias de *KRAS* foi relativamente alto em seminomas, ao passo que Shen et al.⁶¹ identificaram um subconjunto de seminomas com diminuição do número de cópias do mesmo gene.

Mutações pontuais são eventos raros em TCGTs, mas podem ocorrer principalmente nos genes *TP53*, *KIT*, *KRAS*, *BRAF* e *NRAS*⁹⁷. Ao contrário dos casos de TCGT, as linhagens NTERA-2R e JEG3R não apresentaram nenhuma variante em nenhum dos 15 genes avaliados

no painel *Trusight Tumor 15*. Visto que ainda não se conhece o processo mutacional dos TCGTs, não sabemos se sua iniciação e desenvolvimento ocorrem de fato por razões genéticas, epigenéticas, por influência do microambiente tumoral ou mesmo pela associação de todos esses fatores. Uma célula em cultura não sofre a mesma pressão evolutiva que o seu tumor equivalente *in vivo*; o que resulta em um potencial de diferenciação limitado pelas condições de cultivo controladas *in vitro*. Dessa forma, analisar a presença de mutações em tumores e linhagens estabelecidas, nos permite compreender se os dois espécimes compartilham as mesmas variantes mesmo em ambientes díspares.

O gene *TP53* codifica a proteína supressora tumoral p53, que desempenha papel importante no controle do ciclo celular, reparo do DNA e na indução da apoptose, em resposta a sinais de dano celular; e é um dos genes mais frequentemente mutados nos diferentes tipos de câncer^{98,99}. Em nosso trabalho, dentre as mutações conhecidas e preditas como *driver*, 18% se encontravam no gene *TP53*, sendo este o mais comumente mutado em nossa série de casos, em sua maioria não seminomas. Esses dados concordam com os resultados de Necchi et al., dado que variantes em *TP53* foram identificadas em não seminomas e nenhuma alteração em seminomas¹⁰⁰. Em contraste, o banco de dados COSMIC aponta que mutações em *TP53* são raras em TCGTs, com uma frequência de 4% considerando todos os subtipos histológicos. Adicionalmente, mutações em *TP53* mutuamente exclusivas com a amplificação de *MDM2* têm sido associadas à doença resistente à cisplatina^{32,56,101}.

Dentre as variantes identificadas em *TP53*, a variante R273C foi descrita em diferentes tipos de câncer, como o de próstata, laringe, ovário⁹⁹, e associada a um fenótipo mais agressivo em linhagens celulares de pulmão e mama, conferindo maior resistência ao tratamento com cisplatina¹⁰². Embora esta variante tenha sido encontrada em um dos nossos casos sensíveis à cisplatina, o mesmo apresentava doença avançada, em estadio III e risco alto. Zhang et al.¹⁰³ associaram a variante R282W a um menor tempo de sobrevivência e idade de início precoce do primeiro tumor em pacientes com síndrome de Li-Fraumeni. Em nosso estudo, identificamos essa variante em um único caso de TCGT, o que dificulta qualquer associação significativa com a sobrevida global. De fato, os dados ainda são controversos para o status mutacional do gene *TP53* em TCGT, e novos estudos em uma coorte maior são necessários para confirmar se essa associação é verdadeira, posto que o valor de p se aproximou do estabelecido para significância estatística ($p < 0,05$).

O gene *KIT* codifica uma proteína tirosina quinase (*c-KIT*) que, quando ativada por um Fator de Crescimento de Células Tronco, fosforila outras proteínas intracelulares que atuam na proliferação, diferenciação, migração e apoptose; e mutações em *KIT* resultam em proteínas constitutivamente ativas, sem a necessidade do seu ligante específico¹⁰⁴. Em nosso estudo, observamos que o gene *KIT* foi o segundo gene mais frequentemente mutado entre os casos que apresentaram alguma variante conhecida e/ou predita como *driver*; e destes, quase a totalidade eram seminomas. De forma interessante, o banco de dados COSMIC bem como outros estudos, também apontaram uma frequência de mutações em *KIT* prevalente em seminomas, quando comparados aos não seminomas^{69,72,105}.

Dentre as variantes encontradas em *KIT*, a variante N655K foi descrita em pacientes com tumores gastrointestinais¹⁰⁶, mas por ser rara, ainda é mal caracterizada. Por outro lado, as variantes L576P e N822K presentes em três casos de seminoma da nossa coorte, foram observadas anteriormente em seminomas, em casos raros de melanoma maligno, tumores gastrointestinais^{61,70,107-110}. A variante L576P induz mudanças estruturais no *KIT*, que reduz a afinidade de ligação para o imatinibe¹¹¹. Outro estudo identificou a presença de variantes de *KIT*, em lesões precursoras (GCNIS), sugerindo que o gene *KIT* possa ser um dos grandes responsáveis pelo desenvolvimento dos TCGTs seminomatosos a partir de células germinativas neoplásicas; e que a identificação destas variantes poderia auxiliar no diagnóstico da doença em estágio inicial¹¹².

KRAS e *NRAS* são proteínas receptoras de tirosina quinase membros da família RAS, que alternam seu estado conformacional continuamente entre ativo (ligado a GTP) e inativo (ligado a GDP), atuando sobre as vias efetoras a jusante Raf / MEK / ERK e PI3K / PKB / Akt¹¹³. Mutações em *KRAS* e *NRAS* foram identificadas em diversos tipos de câncer, como tumores intracraniais, gastrointestinais, geniturinários, câncer de cabeça e pescoço, câncer de pulmão, mama e pele⁸⁸. Segundo o banco de dados COSMIC, a frequência de mutações em *KRAS* e *NRAS* são de 5 - 9% para seminomas e 2 - 3% para não seminomas. Em outro estudo, mutações em *KRAS* foram encontradas exclusivamente em TCGTs resistentes à cisplatina, mas nenhuma em *NRAS*⁸². Dados do TCGA apontaram mutações em *KRAS* (14%) e *NRAS* (4%) como significativas e exclusivas em seminomas³⁴.

Dentre as variantes identificadas em *KRAS* (G12D e A146T) e *NRAS* (G60R), a variante *KRAS* G12D, foi identificada em casos de TCGTs em indianos¹¹⁴. Zehir et al.¹¹⁵ observou que o códon G12 abrigava 80% de todas as mutações em *KRAS* em diferentes tipos de câncer. Em

nosso estudo, a variante G12D foi observada em um caso de seminoma de bom prognóstico, contrapondo-se a achados em adenocarcinoma pancreático avançado¹¹⁶, no qual a variante G12D foi associada a um pior prognóstico e conseqüentemente a uma sobrevida significativamente diminuída, uma vez que essa variante prejudica a hidrólise de GTP mediada por proteínas ativadoras de GTPase (GAP), favorecendo a formação de *KRAS*-GTP (conformação ativa) e ativando de forma mais potente as vias de sinalização a jusante. A variante *KRAS* A146T, por sua vez, contrasta à variante G12D, uma vez que favorece a formação de *KRAS*-GTP sem interromper a responsividade GAP¹¹⁶. A variante *NRAS* G60R não foi observada em outros estudos.

O gene *BRAF* codifica uma proteína serina/treonina quinase de mesmo nome, membro da família RAF, que atua sobre a via de sinalização MAP quinase / ERK e tem papel importante sobre a proliferação e diferenciação celular³¹. Mutações em *BRAF* são raras em TCGT (< 2%) segundo o banco de dados COSMIC. Em um trabalho realizado pelo nosso grupo de pesquisa, foram analisados 132 casos de TCGT e todos foram V600E do tipo selvagem⁸¹. Em contrapartida, Honecker et al.¹¹⁷ reportaram, pela primeira vez, uma correlação entre a variante V600E e resistência à cisplatina em TCGT não seminomatosos. A variante *BRAF* T599I foi encontrada em três casos de TCGT de nossa coorte, sendo um seminoma em estadió I e dois não seminomas em estadió II. Embora esta variante já tenha sido observada em câncer de tireoide^{118,119} e em um caso de melanoma¹²⁰, não está bem caracterizada.

O receptor do fator de crescimento epidérmico, conhecido como *EGFR* (ou *ERBB*), pertence à família dos receptores de tirosina quinase (*Receptor Tyrosine Kinase* – RTK) e atua sobre as vias de sinalização Ras / Raf / MAPK e PI3K /AKT, com papel importante sobre proliferação, sobrevivência, migração e diferenciação celular.¹²¹ O *ERBB2*, diferentemente de outros membros dessa família, se assemelha ao estado ativado pelo ligante, visto que possui uma conformação fixa¹²¹. Segundo o banco de dados COSMIC, mutações de *EGFR* em TCGT são raras (< 1%). Guerra et al.¹²² analisaram mutações para *EGFR* em 17 casos de seminoma e 6 casos de GCNIS, nos quais foram identificadas três e duas mutações, respectivamente, no éxon 21. A variante de *EGFR* identificada em nosso estudo (T790M), não foi relatada em outros estudos e no banco de dados COSMIC pra TCGTs. No entanto, a variante T790M foi descrita em câncer de pulmão não pequenas células avançado (*Non-Small Cell Lung Cancer* – NSCLC) como uma variante adquirida associada a drogas inibidoras de tirosina quinase (*Tyrosine Kinase Inhibitors* – TKIs)^{123,124}. A variante *ERBB2* V842I é altamente recorrente em

neoplasias colorretais MSI-H¹²⁵ e em células epiteliais pancreáticas, com consequente aumento da fosforilação de AKT¹²⁶.

O receptor alfa do fator de crescimento de plaquetas, conhecido como PDGFRA, codifica um receptor de tirosina quinase, que atua sobre as vias MAPK e PI3K / Akt e tem papel importante no desenvolvimento de órgãos cicatrização de feridas, angiogênese, proliferação e diferenciação celular¹²⁷. Nenhuma variante em PDGFRA foi encontrada no banco de dados COSMIC para TCGT. No entanto, um estudo apontou que a via PDGFRβ-AKT contribui para a resistência adquirida a cisplatina em TCGTs, dado que os níveis de PDGFRβ e AKT estavam superexpressos em linhagens resistentes à cisplatina e, quando tratados com TKIs, se comportaram como células sensíveis¹²⁸. A variante encontrada em *PDGFRA* (S851L) não foi descrita em outros tipos de câncer.

O gene *PIK3CA* codifica a quinase lipídica fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), que atua sobre a via PI3K / Akt e tem papel importante na proliferação, motilidade, invasão e morte celular¹²⁹. De acordo com o banco de dados COSMIC, cerca de 2% dos TCGTs apresentaram mutações em *PIK3CA*. Segundo os dados do TCGA, três seminomas continham mutações *PIK3CA*, dois em E545K e um em N345K³⁴. Feldeman et al.⁸² reportaram, anteriormente, três mutações em *PIK3CA* (uma E542K, duas E545K) em TCGTs resistentes à cisplatina. Dentre as variantes identificadas em *PIK3CA* (Q546H e H1047R), Bilen et al.¹³⁰ identificaram a variante H1047R em três diferentes subtipos histológicos não seminomatosos (Carcinoma Embrionário, Tumor de Seio Endodérmico e Teratoma). Em contrapartida, a variante H1047R foi identificada em um caso de seminoma puro da nossa coorte.

Dentre as limitações do nosso estudo, inclui-se o baixo número de casos da coorte analisada, consequência da baixa prevalência de casos de TCGT. Entretanto, se considerarmos que as populações já estudadas são majoritariamente europeias, o N de nossa coorte de casos brasileiros é interessante para a caracterização molecular proposta. Trata-se de um estudo retrospectivo, que implica um viés de seleção, posto que foi realizado em uma única instituição. Um expressivo número de casos fora excluído, devido a qualidade do material genético das amostras de tecido. Um grande número de casos apresentou histologia de tumores mistos, e nem sempre é possível discriminar as diferentes histologias, para uma análise molecular mais detalhada. Uma vez que mutações pontuais em TCGTs são raras, a análises de *Whole Exome Sequence* (WES) disporia de dados mais aprofundados, permitindo identificar novas variantes em diferentes genes. Por fim, a pandemia da Covid-19 trouxe uma

nova realidade, trazendo consigo novas dificuldades e limitações como a necessidade de trabalho remoto, realização de escalas de trabalho, cortes orçamentários e o aguardo da disponibilidade de equipamentos para a realização dos experimentos.

9 CONCLUSÃO

- O desenvolvimento de um fenótipo de resistência à cisplatina com a linhagem JEG3 em relação à parental, permitirá novos estudos *in vitro*, ampliando o horizonte terapêutico da doença refratária;
- Em uma coorte representativa de uma única instituição e com sobrevida similar a da literatura, o ganho do número de cópias do gene *KRAS* é um evento muito frequente;
- O aumento do número de cópias do gene *KRAS* não está associado significativamente com nenhuma variável clínico-patológica, embora os não seminomas se associem a uma maior taxa de amplificação no número de cópias deste gene;
- Embora mutações pontuais sejam eventos raros em TCGTs, variantes relevantes são identificadas principalmente em *TP53*, *KIT*, *KRAS* e *NRAS*;
- Quarenta por cento dos genes avaliáveis apresentam pelo menos uma variante conhecida e/ou predita como *driver* em um dos 15 genes testados, sendo o *TP53* o gene mais comumente mutado;
- A perspectiva de usar essas informações para a tomada de decisão na prática clínica, deve estimular a realização mais estudos que evidenciem a frequência de mutações específicas no TGCT.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lopes LF, Zubizarreta P, Villarroal M, Castillo L, et al. Protocolo TCG-GALOP-2017: Tumores de Células Germinativas da Infância e Adolescência; **Lemar: São Paulo, Brazil**; 2018.
2. Moran CA, Suster S. Primary germ cell tumors of the mediastinum: I. Analysis of 322 cases with special emphasis on teratomatous lesions and a proposal for histopathologic classification and clinical staging. **Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society**, 1997; 80(4):681-690.
3. Costa AL, Lobo J, Jerónimo C, Henrique R. The epigenetics of testicular germ cell tumors: Looking for novel disease biomarkers. **Epigenomics**, 2017; 9(2):155-169.
4. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, 2021; 71(3):209-249.
5. Trabert B, Chen J, Deves SS, Bray F, McGlynn KA. International patterns and trends in testicular cancer incidence, overall and by histologic subtype, 1973–2007. **Andrology**, 2015; 3(1):4-12.
6. Ghazarian AA, Kelly SP, Altekruse SF, Rosenberg PS, McGlynn KA. Future of testicular germ cell tumor incidence in the United States: forecast through 2026. **Cancer**, 2017; 123(12):2320-2328.
7. Park JS, Kim J, Elghiaty A, Ham WS. Recent global trends in testicular cancer incidence and mortality. **Medicine**, 2018; 97(37).
8. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Siegel R, Torre L, Jemal A. Global and regional estimates of the incidence and mortality for 38 cancers: GLOBOCAN 2018. **World Health Organization, International Agency for Research on Cancer: Lyon, France**, 2018.
9. Soares SCM, Santos KMR, Fernandes FCGM, Barbosa IR, Souza DLB. Testicular cancer mortality in Brazil: trends and predictions until 2030. **BMC urology**, 2019; 19(1):1-8.
10. Ko JJ, Bernard B, Tran B, Li H, Asif T, Stukalin I, et al. Conditional survival of patients with metastatic testicular germ cell tumors treated with first-line curative therapy. **Journal of Clinical Oncology**, 2016; 34(7):714-720.
11. Cárcano FM. Estudo de alterações moleculares e genéticas nos tumores de células germinativas do testículo e suas associações clínico-patológicas. **Tese (Doutorado)**. Barretos: Fundação PIO XII; 2016.
12. Seetharam V, Hameed ZB, Talengala SB, Thomas J. Bilateral cryptorchidism with bilateral synchronous abdominal testicular germ cell tumour. **Case Reports**, 2014, p. bcr2013203085.

13. Fossa SD, Chen J, Schonfeld SJ, McGlynn KA, McMaster ML, Gail MH, et al. Risk of Contralateral Testicular Cancer: A Population-Based Study of 29515 US Men. **The Journal of Urology**, 2006; 175(3):960-961.
14. Kier MG, Hansen MK, Lauritsen J, Mortensen MS, Bandak M, Agerbaek M, et al. Second malignant neoplasms and cause of death in patients with germ cell cancer: a Danish nationwide cohort study. **JAMA oncology**, 2016; 2(12):1624-1627.
15. Hemminki K, Li X. Familial risk in testicular cancer as a clue to a heritable and environmental aetiology. **British journal of cancer**, 2004; 90(9):1765-1770.
16. Hemminki K, Chen B. Familial risks in testicular cancer as aetiological clues. **International journal of andrology**, 2006; 29(1):205-10.
17. Chia VM, Li Y, Goldin LR, Graubard BI, Greene MH, Korde L, et al. Risk of cancer in first- and second-degree relatives of testicular germ cell tumor cases and controls. **International journal of cancer**, 2009; 124(4):952-957.
18. Frank C, Fallah M, Sundquist J, Hemminki A, Hemminki K. Population landscape of familial cancer. **Scientific reports**, 2015; 5(1):1-8.
19. Zhang L, Yu H, Hemminki O, Försti A, Sundquist K, Hemminki K. Familial associations in testicular cancer with other cancers. **Scientific reports**, 2018; 8(1):1-5.
20. Walsh TJ, Croughan MS, Schembri M, Chan JM, Turek PJ. Increased risk of testicular germ cell cancer among infertile men. **Archives of internal medicine**, 2009; 169(4):351-356.
21. Anderson RE, Hanson HA, Patel DP, Johnstone E, Aston KI, Carrell DT, et al. Cancer risk in first- and second-degree relatives of men with poor semen quality. **Fertility and sterility**, 2016; 106(3):731-738.
22. Hanson HA, Anderson RE, Aston KI, Carrell DT, Smit, K, Hotaling JM. Subfertility increases risk of testicular cancer: evidence from population-based semen samples. **Fertility and sterility**, 2016; 105(2):322-328.
23. Nagirnaja L, Aston KI, Conrad DF. Genetic intersection of male infertility and cancer. **Fertility and sterility**, 2018; 109(1):20-26.
24. Hanson BM, Eisenberg ML, Hotaling JM. Male infertility: a biomarker of individual and familial cancer risk. **Fertility and sterility**, 2018; 109(1):6-19.
25. Del Giudice F, Kasman AM, De Berardinis E, Busetto GM, Belladelli F. Association between male infertility and male-specific malignancies: systematic review and meta-analysis of population-based retrospective cohort studies. **Fertility and Sterility**, 2020; 114(5):984-996.

26. SEER Cancer Statistics Review - National Cancer Institute. Bethesda; 2021. Acesso em: 20 de junho de 2021. Disponível em: https://seer.cancer.gov/csr/1975_2018/.
27. Meeks JJ, Sheinfeld J, Eggener SE. Environmental toxicology of testicular cancer. In: Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations. **Elsevier**; 2012. p. 212-215.
28. Bonde JP, Flachs EM, Rimborg S, Glazer CH, Giwercman A, Ramlau-Hansen CH. The epidemiologic evidence linking prenatal and postnatal exposure to endocrine disrupting chemicals with male reproductive disorders: a systematic review and meta-analysis. **Human reproduction update**, 2017; 23(1):104-125.
29. Giannandrea F, Fagnoli S. Environmental factors affecting growth and occurrence of testicular cancer in childhood: An overview of the current epidemiological evidence. **Children**, 2017; 4(1):1.
30. Bray F, Ferlay J, Devesa SS, McGlynn KA, Møller H. Interpreting the international trends in testicular seminoma and nonseminoma incidence. **Nature clinical practice Urology**, 2006; 3(10):532-543.
31. Sheikine Y, Genega E, Melamed J, Lee P, Reuter VE, Ye H. Molecular genetics of testicular germ cell tumors. **Am J Cancer Res.**, 2012; 2(2):153-67.
32. Boublikova L, Buchler T, Stary J, Abrahamova J, Trka J. Molecular biology of testicular germ cell tumors: Unique features awaiting clinical application. **Crit Rev Oncol Hematol.**, 2014; 89(3):366-85.
33. Moch H, Cubilla AL, Humphrey PA, Reuter VE, Ulbright TM. The 2016 WHO classification of tumours of the urinary system and male genital organs—part A: renal, penile, and testicular tumours. **Eur. Urol.**, 2016; 70:93–105.
34. Cheng L, Albers P, Berney DM, Feldman DR, Daugaard G, Gilligan T, Looijenga LH. Testicular cancer. **Nature Reviews Disease Primers**, 2018; 4(1):29.
35. Amin MB, Greene FL, Edge SB, Compton CC, Gershewald JE, Brookland RK, et al. The eighth edition AJCC cancer staging manual: continuing to build a bridge from a population-based to a more “personalized” approach to cancer staging. **CA: a cancer journal for clinicians**, 2017;67(2):93-99.
36. Albers P, Albrecht W, Algaba F, Bokemeyer C, Cohn-Cedermark G, Fizazi K, et al. Guidelines on testicular cancer: 2015 update. **European urology**, 2015; 68(6):1054-1068.
37. Fizazi K, Culine S, Kramar A, Amato RJ, Bouzy J, Chen I, et al. Early predicted time to normalization of tumor markers predicts outcome in poor-prognosis nonseminomatous germ cell tumors. **J Clin Oncol.**, 2004; 22(19):3868-3876.

38. Winter C, Albers P. Testicular germ cell tumors: pathogenesis, diagnosis and treatment. **Nature Reviews Endocrinology**, 2011; 7(1):43.
39. Fedyanin M, Tryakin A, Bulanov A, Fainshtein I, Zakharova T, Matveev V, et al. Effect of the timing of orchiectomy on survival in patients with metastatic germ cell tumors of testis. In: **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**. Elsevier, 2014, p.27-32. e33.
40. Gilligan T, Lin DW, Aggarwal R, Chism D, Cost N, Derweesh IH, et al. Testicular cancer, version 2.2020, NCCN clinical practice guidelines in oncology. **Journal of the National Comprehensive Cancer Network**, 2019; 17(12):1529-1554.
41. Einhorn LH. Treatment of testicular cancer: a new and improved model. **Journal of clinical oncology**, 1990; 8(11):1777-1781.
42. Shibley L, Brown M, Schuttinga J, Rothen-berg M, Whalen J. Cisplatin-based combination chemotherapy in the treatment of advanced-stage testicular cancer: cost-benefit analysis. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, 1990; 82(3):186-192.
43. Nakamura T, Miki T. Recent strategy for the management of advanced testicular cancer. **International journal of urology**, 2010; 17(2):148-157.
44. Shanmugalingam T, Soultati A, Chowdhury S, Rudman S, Van Hemelrijck M. Global incidence and outcome of testicular cancer. **Clinical epidemiology**, 2013; 5:417.
45. Bakardjieva-Mihaylova V, Skvarova Kramarzova K, Slamova M, Svaton M, Rejlova K, Zaliova M. Molecular basis of cisplatin resistance in testicular germ cell tumors. **Cancers**, 2019; 11(9):1316.
46. Beyer J, Albers P, Altena R, Aparicio J, Bokemeyer C, Busch J. Maintaining success, reducing treatment burden, focusing on survivorship: highlights from the third European consensus conference on diagnosis and treatment of germ-cell cancer. **Annals of oncology**, 2013; 24(4):878-888.
47. Vries G, Rosas-Plaza X, Van Vugt MA, Gietema JA, Jong S. Testicular cancer: determinants of cisplatin sensitivity and novel therapeutic opportunities. **Cancer Treatment Reviews**, 2020; 88:102054.
48. Mayer F, Honecker F, Looijenga LHJ, Bokemeyer C. Towards an understanding of the biological basis of response to cisplatin-based chemotherapy in germ-cell tumors. **Annals of oncology**, 2003; 14(6):825-832.
49. Schweyer S, Soruri A, Meschter O, Heintze A, Zschunke F, Miosge, N. Cisplatin-induced apoptosis in human malignant testicular germ cell lines depends on MEK/ERK activation. **British journal of cancer**, 2004; 91(3):589.

50. García-Velasco A, Durán I, García E, Tarón M, Ballestín C, Castellanos D. Biological markers of cisplatin resistance in advanced testicular germ cell tumours. **Clinical and Translational Oncology**, 2012; 14(6):452-457.
51. Jacobsen C, Honecker F. Cisplatin resistance in germ cell tumours: models and mechanisms. **Andrology**, 2015; 3(1):111-121.
52. Pierce JL, Frazier AL, Amatruda JF. Pediatric germ cell tumors: a developmental perspective. **Advances in urology**, 2018; v. 2018.
53. Pinto MT, Cárcano FM, Vieira AGS, Cabral, ERM, Lopes LF. Molecular Biology of Pediatric and Adult Male Germ Cell Tumors. **Cancers**, 2021; 13(10):2349.
54. Vega A, Baptissart M, Caira F, Brugnion F, Lobaccaro JMA, Volle DH. Epigenetic: a molecular link between testicular cancer and environmental exposures. **Frontiers in endocrinology**, 2012; 3:150.
55. Bezan A, Gerger A, Pichler M. MicroRNAs in testicular cancer: implications for pathogenesis, diagnosis, prognosis and therapy. **Anticancer research**, 2014; 34(6): 2709-2713.
56. Bagrodia A, Lee BH, Lee W, Cha EK, Sfakianos JP, Iyer G, et al. Genetic determinants of cisplatin resistance in patients with advanced germ cell tumors. **Journal of Clinical Oncology**, 2016; 34(33):4000.
57. Lafin JT, Bagrodia A, Woldu S, Amatruda JF. New insights into germ cell tumor genomics. **Andrology**, 2019; 7(4):507-515.
58. Rodriguez S, Jafer O, Goker H, Summersgill BM, Zafarana G, Gillis AJ, et al. Expression profile of genes from 12p in testicular germ cell tumors of adolescents and adults associated with i(12p) and amplification at 12p11.2-p12.1. **Oncogene**. 2003; 22(12):1880-91.
59. Loveday C, Litchfield K, Proszek PZ, Cornish AJ, Santo F, Levy M, et al. Genomic landscape of platinum resistant and sensitive testicular cancers. **Nature Communications**, 2020; 11(1):1-12.
60. Frigyesi A, Gisselsson D, Hansen GB, Soller M, Mitelman F, Höglund M. A model for karyotypic evolution in testicular germ cell tumors. **Genes, Chromosomes and Cancer**, 2004; 40(3):172-178.
61. Shen H, Shih J, Hollern DP, Wang L, Bowlby R, Tickoo SK, et al. Integrated molecular characterization of testicular germ cell tumors. **Cell reports**, 2018; 23(11):3392-3406.
62. Fichtner A, Richter A, Filmar S, Gaisa NT, Schweyer S, Reis H, et al. The detection of isochromosome i (12p) in malignant germ cell tumours and tumours with somatic

malignant transformation by the use of quantitative real-time polymerase chain reaction. **Histopathology**, 2021; 78(4):593-606.

63. Cheng L, Davidson DD, Montironi R, Wang M, Lopez-Beltran A, Masterson TA, et al. *Fluorescence in situ hybridization (FISH) detection of chromosomal 12p anomalies in testicular germ cell tumors*. In: Bagrodia A, Amatudra JF. Testicular Germ Cell Tumors. **New York: Humana**; 2021. p. 49-63.
64. Oosterhuis JW, Looijenga LH, van Echten J, Jong B. Chromosomal constitution and developmental potential of human germ cell tumors and teratomas. **Cancer genetics and cytogenetics**, 1997; 95(1):96-102.
65. Summersgill B, Goker H, Weber-Hall S, Huddart R, Horwich A, Shipley J. Molecular cytogenetic analysis of adult testicular germ cell tumours and identification of regions of consensus copy number change. **British journal of cancer**, 1998; 77(2):305-313.
66. Looijenga LH, Rosenberg C, van Gorp RJ, Geelen E, van Echten-Arends J, Jong B, Mostert M, Oosterhuis JW. Comparative genomic hybridization of microdissected samples from different stages in the development of a seminoma and a non-seminoma. **The Journal of pathology**, 2000; 191(2):187-92.
67. Kraggerud SM, Skotheim RI, Szymanska J, Eknæs M, Fosså SD, Stenwig AE, Peltomäki P, Lothe RA. Genome profiles of familial/bilateral and sporadic testicular germ cell tumors. **Genes, Chromosomes and Cancer**, 2002; 34(2):168-74.
68. Ichikawa M, Arai Y, Haruta M, Furukawa S, Ariga T, Kajii T, Kaneko Y. Meiosis error and subsequent genetic and epigenetic alterations invoke the malignant transformation of germ cell tumor. **Genes, Chromosomes and Cancer**, 2013; 52(3):274-86.
69. Litchfield K, Summersgill B, Yost S, Sultana R, Labreche K, Dudakia D et al. Whole-exome sequencing reveals the mutational spectrum of testicular germ cell tumours. **Nature communications**, 2015; 6(1):1-8.
70. Cutcutache I, Suzuki Y, Tan IB, Ramgopal S, Zhang S, Ramnarayanan K, et al. Exome-wide sequencing shows low mutation rates and identifies novel mutated genes in seminomas. **European urology**, 2015; 68(1):77-83.
71. Taylor-Weiner A, Zack T, O'Donnell E, Guerriero JL, Bernard B, Reddy A, et al. Genomic evolution and chemoresistance in germ-cell tumours. **Nature**, 2016; 540(7631):114-118.
72. Kemmer K, Corless CL, Fletcher JA, McGreevey L, Haley A, Griffith D, et al. KIT mutations are common in testicular seminomas. **The American journal of pathology**, 2004; 164(1):305-313.
73. McIntyre A, Summersgill B, Grygalewicz B, Gillis AJ, Stoop J, van Gorp RJ, et al. Amplification and overexpression of the KIT gene is associated with progression in the

seminoma subtype of testicular germ cell tumors of adolescents and adults. **Cancer research**, 2005a; 65(18):8085-8089.

74. McIntyre A, Summersgill B, Spendlove HE, Huddart R, Houlston R, Shipley J. Activating mutations and/or expression levels of tyrosine kinase receptors GRB7, RAS, and BRAF in testicular germ cell tumors. **Neoplasia**, 2005b; 7(12):1047-1052.
75. Goddard NC, McIntyre A, Summersgill B, Gilbert D, Kitazawa S, Shipley J. KIT and RAS signalling pathways in testicular germ cell tumours: new data and a review of the literature. **International journal of andrology**, 2007; 30(4):337-349.
76. Peng HQ, Hogg D, Malkin D, Bailey D, Gallie BL, Bulbul M, et al. Mutations of the p53 gene do not occur in testis cancer. **Cancer research**, 1993; 53(15):3574-3578.
77. Houldsworth J, Xiao H, Murty VVVS, Chen W, Ray B, Reuter VE, et al. Human male germ cell tumor resistance to cisplatin is linked to TP53 gene mutation. **Oncogene**, 1998; 16(18):2345-2349.
78. Piulats JM, Vidal A, Villanueva A, Muñoz C, Pisa A, Nadal M, et al. MLH1 and BRAF status analysis in metastatic germ cell tumors. **Journal of Clinical Oncology**, 2010; 28(15):e15092-e15092.
79. Masqué-Soler N, Szczepanowski M, Leuschner I, Vokuhl C, Haag J, Calaminus G, Klapper W. Absence of BRAF mutation in pediatric and adolescent germ cell tumors indicate biological differences to adult tumors. **Pediatric blood & cancer**, 2012; 59(4):732-735.
80. Satpute SR, Koster R, Nathanson KL, Vaughn DJ, Albany C, Einhorn LH, Hanna NH. Retrospective, correlative study of BRAF mutation V600E in testicular cancer patients. **Journal of Clinical Oncology**, 2013; 31(15):e15584-e15584.
81. Cárcano FM, Lengert AH, Vidal DO, Scapulatempo Neto C, Queiroz L, Marques H. Absence of microsatellite instability and BRAF (V600E) mutation in testicular germ cell tumors. **Andrology**, 2016; 4(5):866-872.
82. Feldman DR, Iyer G, Van Alstine L, Patil S, Al-Ahmadie H, Reuter VE, et al. Presence of somatic mutations within PIK3CA, AKT, RAS, and FGFR3 but not BRAF in cisplatin-resistant germ cell tumors. **Clinical Cancer Research**, 2014; 20(14):3712-3720.
83. Juliachs M, Munoz C, Moutinho CA, Vidal A, Condom E, Esteller M, et al. The PDGFR β -AKT pathway contributes to CDDP-acquired resistance in testicular germ cell tumors. **Clinical Cancer Research**, 2014; 20(3):658-667.
84. Kolch W. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. **The Biochemical journal**, 2000; 351(2):289-305.

85. Rajagopalan H, Bardelli A, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE. Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. **Nature**, 2002; 418(6901):934.
86. Sommerer F, Hengge UR, Markwarth A, Vomschloss S, Stolzenburg JU, Wittekind C, Tannapfel, A. Mutations of BRAF and RAS are rare events in germ cell tumours. **International journal of cancer**, 2005; 113(2):329-335.
87. McIntyre A, Summersgill B, Spendlove HE, Huddart R, Houlston R, Shipley J. Activating mutations and/or expression levels of tyrosine kinase receptors GRB7, RAS, and BRAF in testicular germ cell tumors. **Neoplasia**, 2005; 7(12):1047-1052.
88. Kodaz H, Kostek O, Hacıoglu MB, Erdogan B, Kodaz CE, Hacibekiroglu I. Frequency of RAS mutations (KRAS, NRAS, HRAS) in human solid cancer. **Breast cancer**, 2017; 7(12):1-7.
89. Woldu SL, Amatruda JF, Bagrodia A. Testicular germ cell tumor genomics. **Current opinion in urology**, 2017; 27(1):41.
90. Kernek KM, Brunelli M, Ulbright TM, Eble JN, Martignoni G, Zhang S, et al. Fluorescence in situ hybridization analysis of chromosome 12p in paraffin-embedded tissue is useful for establishing germ cell origin of metastatic tumors. **Modern pathology**, 2004; 17(11):1309-1313.
91. Looijenga LHJ, Gillis AJM, Stoop H, Biermann K, Oosterhuis JW. Dissecting the molecular pathways of (testicular) germ cell tumour pathogenesis; from initiation to treatment-resistance. **Int J Androl.**, 2011; 34(4Pt2):234-51.
92. Daugaard G, Gundgaard MG, Mortensen MS, Agerbæk M, Holm NV, Rørth M, et al. Surveillance for stage I nonseminoma testicular cancer: outcomes and long-term follow-up in a population-based cohort. **J Clin Oncol**, 2014; 32(34):3817-23.
93. Mortensen MS, Lauritsen J, Gundgaard MG, Agerbæk M, Holm NV, Christensen IJ, et al. A nationwide cohort study of stage I seminoma patients followed on a surveillance program. **European urology**, 2014; 66(6):1172-1178.
94. Lobo J, Costa AL, Vilela-Salgueiro B, Rodrigues A, Guimaraes R, Cantante M, et al. Testicular germ cell tumors: revisiting a series in light of the new WHO classification and AJCC staging systems, focusing on challenges for pathologists. **Human pathology**, 2018; 82:113-124.
95. International Prognostic Factors Study Group. Prognostic factors in patients with metastatic germ cell tumors who experienced treatment failure with cisplatin-based first-line chemotherapy. **Journal of Clinical Oncology**, 2010; 28(33):4906-4911.
96. Lorch A, Kleinhans A, Kramar A, Kollmannsberger CK, Hartmann JT, Bokemeyer C, et al. Sequential versus single high-dose chemotherapy in patients with relapsed or refractory

germ cell tumors: long-term results of a prospective randomized trial. **J Clin Oncol**, 2012; 30(8):800-5, 2012.

97. Gonzalez-Exposito R, Merino M, Aguayo C. Molecular biology of testicular germ cell tumors. **Clinical and Translational Oncology**, 2016; 18(6):550-556.
98. Donehower LA, Soussi T, Korkut A, Liu Y, Schultz A, Cardenas M, et al. Integrated analysis of TP53 gene and pathway alterations in the cancer genome atlas. **Cell reports**, 2019; 28(5):1370-1384.
99. Petitjean A, Mathe E, Kato S, Ishioka C, Tavtigian SV, Hainaut P, Olivier M. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. **Human mutation**, 2007; 28(6):622-629.
100. Necchi A, Bratslavsky G, Corona RJ, Chung JH, Millis SZ, Elvin JA, et al. Genomic characterization of testicular germ cell tumors relapsing after chemotherapy. **European urology focus**, 2020; 6(1):122-130.
101. Kersemaekers AMF, Mayer F, Molier M, van Weeren PC, Oosterhuis JW, Bokemeyer C, et al. Role of P53 and MDM2 in treatment response of human germ cell tumors. **Journal of Clinical Oncology**, 2002; 20(6):1551-1561.
102. Li J, Yang L, Gaur S, Zhang K, Wu X, Yuan YC, et al. Mutants TP 53 p. R273H and p. R273C but not p. R273G Enhance Cancer Cell Malignancy. **Human mutation**, 2014; 35(5):575-584.
103. Zhang Y, Coillie SV, Fang JY, Xu J. Gain of function of mutant p53: R282W on the peak? **Oncogenesis**, 2016; 5(2):e196-e196.
104. Rubin BP, Singer S, Tsao C, Duensing A, Lux ML, Ruiz R, et al. KIT activation is a ubiquitous feature of gastrointestinal stromal tumors. **Cancer research**, 2001; 61(22):8118-8121.
105. Coffey J, Linger R, Pugh J, Dudakia D, Sokal M, Easton DF, et al. Somatic KIT mutations occur predominantly in seminoma germ cell tumors and are not predictive of bilateral disease: report of 220 tumors and review of literature. **Genes, Chromosomes and Cancer**, 2008; 47(1):34-42.
106. Fornasarig M, Gasparotto D, Foltran L, Campigotto M, Lombardi S, Del Savio E, et al. A novel kindred with familial gastrointestinal stromal tumors caused by a rare kit germline mutation (n655k): Clinico-pathological presentation and tki sensitivity. **Journal of Personalized Medicine**, 2020; 10(4)234.
107. Willmore-Payne C, Holden JA, Chadwick BE, Layfield LJ. Detection of c-kit exons 11-and 17-activating mutations in testicular seminomas by high-resolution melting amplicon analysis. **Modern pathology**, 2006; 19(9):1164-1169.

108. Nakai Y, Nonomura N, Oka D, Shiba M, Arai Y, Nakayama M, et al. KIT (c-kit oncogene product) pathway is constitutively activated in human testicular germ cell tumors. **Biochemical and biophysical research communications**, 2005; 337(1):289-296.
109. Ichimura K, Fukushima S, Totoki Y, Matsushita Y, Otsuka A, Tomiyama A, et al. Recurrent neomorphic mutations of MTOR in central nervous system and testicular germ cell tumors may be targeted for therapy. **Acta neuropathologica**, 2016; 131(6):889-901.
110. Bignell G, Smith R, Hunter C, Stephens P, Davies H, Greenman C, et al. Sequence analysis of the protein kinase gene family in human testicular germ-cell tumors of adolescents and adults. **Genes, Chromosomes and Cancer**, 2006; 45(1):42-46.
111. Woodman SE, Trent JC, Stemke-Hale K, Lazar AJ, Priol S, Pavan GM, et al. Activity of dasatinib against L576P KIT mutant melanoma: molecular, cellular, and clinical correlates. **Molecular cancer therapeutics**, 2009; 8(8):2079-2085.
112. Biermann K, Göke F, Nettersheim D, Eckert D, Zhou H, Kahl P, et al. c-KIT is frequently mutated in bilateral germ cell tumours and down-regulated during progression from intratubular germ cell neoplasia to seminoma. **The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland**, 2007; 213(3):311-318.
113. Colicelli, J. Human RAS superfamily proteins and related GTPases. **Science's STKE**, 2004; 2004(250):re13-re13.
114. Ahmad F, Surve P, Natarajan S, Patil A, Pol S, Patole K, Das BR. Aberrant epigenetic inactivation of RASSF1A and MGMT gene and genetic mutations of KRAS, cKIT and BRAF in Indian testicular germ cell tumours. **Cancer genetics**, 2020; 241:42-50.
115. Zehir A, Benayed R, Shah RH, Syed A, Middha S, Kim HR, et al. Mutational landscape of metastatic cancer revealed from prospective clinical sequencing of 10,000 patients. **Nature medicine**, 2017; 23(6):703-713.
116. Bournet B, Muscari F, Buscail C, Assenat E, Barthet M, Hammel P, et al. KRAS G12D mutation subtype is a prognostic factor for advanced pancreatic adenocarcinoma. **Clinical and translational gastroenterology**, 2016; 7(3):e157.
117. Honecker F, Wermann H, Mayer F, Gillis AJ, Stoop H, van Gurp RJ, Oechsle K, Steyerberg E, Hartmann JT, Dinjens WN, Oosterhuis JW. Microsatellite instability, mismatch repair deficiency, and BRAF mutation in treatment-resistant germ cell tumors. **Journal of clinical oncology**, 2009; 27(13):2129-36.
118. Cacciato Insilla A, Proietti A, Borrelli N, Macerola E, Niccoli C, Vitti P, et al. TERT promoter mutations and their correlation with BRAF and RAS mutations in a consecutive cohort of 145 thyroid cancer cases. **Oncology letters**, 2018; 15(3):2763-2770.

119. Murugan AK, Qasem E, Al-Hindi H, Shi Y, Alzahrani, AS. Classical V600E and other non-hotspot BRAF mutations in adult differentiated thyroid cancer. **Journal of Translational Medicine**, 2016; 14(1):1-8.
120. Gallo S, Coha V, Caravelli D, Becco P, Venesio T, Zaccagna A, et al. BRAF-inhibitors can exert control of disease in BRAF T599I mutated melanoma: a case report. **Melanoma research**, 2018; 28(2):143-146.
121. Huang L, Fu L. Mechanisms of resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 5, n. 5, p. 390-401, 2015.
122. Guerra F, Quintana S, Giustina S, Mendeluk G, Jufe L, Avagnina MA, et al. Investigation of EGFR/pi3k/Akt signaling pathway in seminomas. **Biotechnic & Histochemistry**, 2021; 96(2):125-137.
123. Jenkins S, Yang JC, Ramalingam SS, Yu K, Patel S, Weston S, et al. Plasma ctDNA analysis for detection of the EGFR T790M mutation in patients with advanced non-small cell lung cancer. **Journal of Thoracic Oncology**, 2017; 12(7):1061-1070.
124. Wang S, Cang S, Liu D. Third-generation inhibitors targeting EGFR T790M mutation in advanced non-small cell lung cancer. **Journal of hematology & oncology**, 2016; 9(1):1-7.
125. Kloth M, Ruessler V, Engel C, Koenig K, Peifer M, Mariotti E, et al. Activating ERBB2/HER2 mutations indicate susceptibility to pan-HER inhibitors in Lynch and Lynch-like colorectal cancer. **Gut**, 2016; 65(8):1296-1305.
126. Li Z, Shao C, Liu X, Lu X, Jia X, Zheng X, et al. Oncogenic ERBB2 aberrations and KRAS mutations cooperate to promote pancreatic ductal adenocarcinoma progression. **Carcinogenesis**, 2020; 41(1):44-55.
127. Dai J, Yang L, Xu T, Si L, Cui C, Sheng X, et al. A Functional synonymous variant in PDGFRA is associated with better survival in acral melanoma. **Journal of Cancer**, 2020; 11(10):2945.
128. Juliachs M, Munoz C, Moutinho CA, Vidal A, Condom E, Esteller M, et al. The PDGFR β -AKT pathway contributes to CDDP-acquired resistance in testicular germ cell tumors. **Clinical Cancer Research**, 2014; 20(3):658-667.
129. Samuels Y, Waldman T. Oncogenic mutations of PIK3CA in human cancers. **Phosphoinositide 3-kinase in Health and Disease**, 2010; p. 21-41.
130. Bilen MA, Hess KR, Campbell MT, Wang J, Broaddus RR, Karam JA, et al. Intratumoral heterogeneity and chemoresistance in nonseminomatous germ cell tumor of the testis. **Oncotarget**, 2016; 7(52):86280, 2016.