

BEATRIZ VARATOJO COSTA

Licenciada em Biologia Celular e Molecular

NOVA METODOLOGIA PARA O DIAGNÓSTICO E MONITORIZAÇÃO DO ADENOCARCINOMA DUCTAL PANCREÁTICO

MESTRADO EM GENÉTICA MOLECULAR E BIOMEDICINA

Universidade NOVA de Lisboa

novembro, 2021

NOVA METODOLOGIA PARA O DIAGNÓSTICO E MONITORIZAÇÃO DO ADENOCARCINOMA DUCTAL PANCREÁTICO

BEATRIZ VARATOJO COSTA

Licenciada em Biologia Celular e Molecular

Orientador: Doutor Pedro Miguel Ribeiro Viana Baptista
Professor Catedrático,
NOVA School of Science and Technology, Universidade NOVA de Lisboa

Coorientadora: Doutora Maria Alexandra Nuncio de Carvalho Ramos Fernandes
Professora Auxiliar,
NOVA School of Science and Technology, Universidade NOVA de Lisboa

Júri:

Presidente: Doutora Margarida Casal Ribeiro Castro Caldas Braga
Professora Auxiliar da NOVA School of Science and Technology,
Universidade NOVA de Lisboa

Arguente: Doutora Ana Rita Fialho Grosso
Investigadora da NOVA School of Science and Technology, Uni-
versidade NOVA de Lisboa

Orientador: Doutor Pedro Miguel Ribeiro Viana Baptista
Professor Catedrático da NOVA School of Science and Techno-
logy, Universidade NOVA de Lisboa

MESTRADO EM GENÉTICA MOLECULAR E BIOMEDICINA

Universidade NOVA de Lisboa
novembro, 2021

Nova Metodologia para o Diagnóstico e Monitorização do Adenocarcinoma Ductal Pancreático

Copyright © Beatriz Varatojo Costa, NOVA School of Science and Technology | FCT NOVA

A NOVA School of Science and Technology | FCT NOVA e a Universidade NOVA de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

AGRADECIMENTOS

Agradecimento à Fundação para a Ciência e a Tecnologia, I.P., (FCT): UIDP/04378/2020 e UIDB/04378/2020 para UCIBIO; LA/P/0140/2020 para i4HB.

Gostava de agradecer aos meus orientadores, o Doutor Pedro Viana Baptista e a Doutora Alexandra R. Fernandes, por me terem proporcionado a oportunidade de desenvolver a minha tese de mestrado nos seus laboratórios, e por toda a disponibilidade e ajuda prestada ao longo deste ano.

Gostava também de agradecer a todos os membros dos laboratórios de Nanobiomedicine e Human Genetics and Cancer Therapeutics da NOVA School of Science and Technology, Universidade NOVA de Lisboa. Um agradecimento especial à Beatriz Oliveira por ter estado sempre disponível para me ensinar e ajudar ao longo do trabalho experimental, e à Patrícia Rodrigues, que me acompanhou e apoiou ao longo desta etapa.

Um agradecimento especial à minha família, em particular aos meus pais, Sandra e Avelino, à minha avó Natália e à minha tia Liliana, por estarem sempre ao meu lado e me apoiarem incondicionalmente em todos os momentos.

Por último, não posso deixar de agradecer o apoio incansável dos meus amigos, em especial a Inês Neto, Inês Silva, Margarida Simões e Neuza Sousa, que, embora distantes, estiveram sempre presentes, tendo sido um apoio fundamental ao longo deste ano.

RESUMO

O cancro pancreático destaca-se como o cancro com a menor taxa de sobrevivência na Europa, sendo que o adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC) constitui 95% dos casos. O prognóstico de PDAC depende fortemente de plano de rastreio pois os sintomas são negligenciáveis nos estadios iniciais da doença, o que leva a que aquando do diagnóstico 80% dos tumores sejam localmente avançados ou metastáticos. A recorrência do cancro em 80% dos doentes após ressecção cirúrgica contribui igualmente para a reduzida taxa de sobrevivência.

Para melhorar o prognóstico do PDAC é fundamental identificar biomarcadores para diagnóstico e monitorização da doença, concomitantemente ao desenvolvimento de metodologias para a sua caracterização. A utilização de biópsias líquidas, particularmente a análise de DNA tumoral circulante (ctDNA), destaca-se como uma abordagem pouco invasiva de análise de biomarcadores libertados pela massa tumoral e suas metástases. De referir que mutações no gene *KRAS* são detetadas em mais de 90% dos doentes, tornando-se num potencial biomarcador de PDAC. A análise mutacional de *KRAS* em amostras de tecido tumoral e ctDNA demonstrou potencial no âmbito do diagnóstico diferencial de PDAC, permitindo a identificação de doentes com maior risco de recorrência.

Neste projeto, foi desenvolvida e otimizada uma metodologia de *Amplification Refractory Mutation System* (ARMS) acoplada a *High Resolution Melting Analysis* (HRMA) para deteção das duas mutações de *KRAS* mais frequentes em PDAC. Após otimização em material genómico controlo, a estratégia foi validada com amostras tumorais e de plasma de doentes com PDAC, e os resultados comparados aos obtidos por Sequenciação de Sanger (SS), o método de referência para análise mutacional.

A estratégia ARMS/HRMA desenvolvida destaca-se por menor tempo de resposta comparativamente a SS, tendo revelado sensibilidade e especificidade para a deteção de ambas as mutações em amostras tumorais. A deteção de mutações em ctDNA extraído de plasma não demonstrou a mesma sensibilidade.

Palavras chave: PDAC; *KRAS*; biópsia líquida; ctDNA; ARMS; HRMA

ABSTRACT

Pancreatic cancer stands out as the cancer with the lowest survival rate in Europe, with pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) accounting for 95% of cases. The absence of screening tests and symptoms in the initial stages of the disease means that at the time of diagnosis of PDAC 80% of tumors are locally advanced or metastatic, which contributes to the reduced survival rate. Furthermore, the survival rate is also impacted by the recurrence of cancer, which occurs in 80% of patients after resection surgery with curative intent.

The identification of biomarkers and development of new methodologies for their analysis is essential to change the prognosis associated with PDAC. In this context, liquid biopsies, particularly the analysis of circulating tumor DNA (ctDNA), are emerging as an interesting tool in the diagnosis and monitoring of PDAC. Mutations in *KRAS* are detected in more than 90% of patients, so *KRAS* stands out as a potential biomarker of PDAC. Mutational analysis of *KRAS* in tumor tissue and ctDNA samples may contribute to improve the diagnosis of PDAC and support the identification of patients at higher risk of recurrence.

In this project, an Amplification Refractory Mutation System (ARMS) methodology coupled with High Resolution Melting Analysis (HRMA) was developed for detection of the two most prevalent *KRAS* mutations in PDAC. After reaction optimization with cell lines, the methodology was validated using tumor and plasma samples from patients with PDAC, and the results compared to those obtained by Sanger Sequencing (SS), the gold-standard method for mutational analysis.

The developed ARMS/HRMA, which stands out for its reduced response time compared to SS, demonstrated sensitivity and specificity for the detection of both mutations in tumor samples, however, the same was not verified regarding its detection in ctDNA extracted from plasma.

Keywords: PDAC; *KRAS*; liquid biopsy; ctDNA; ARMS; HRMA

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. <i>Cancro do Pâncreas, um “assassino silencioso”</i>	1
1.1.1. A identificação de biomarcadores como um dos principais desafios no diagnóstico e monitorização do PDAC	1
1.2. <i>O gene KRAS como potencial biomarcador do PDAC</i>	2
1.2.1. <i>KRAS como biomarcador para o diagnóstico do PDAC</i>	4
1.2.2. <i>O potencial da análise mutacional de KRAS em ctDNA no PDAC</i>	6
1.2.2.1. <i>KRAS como biomarcador para rastreio e diagnóstico precoce de PDAC</i>	7
1.2.2.2. <i>KRAS como biomarcador de prognóstico e preditivo de recorrência no PDAC</i> ...	9
1.3. <i>Análise mutacional de KRAS</i>	10
PCR em Tempo Real	11
<i>Amplification Refractory Mutation System (ARMS)</i>	12
<i>High-Resolution Melting Analysis (HRMA)</i>	15
<i>Sequenciação de Sanger (SS) - gold standard</i>	17
1.4. <i>Contexto e Objetivo da Tese</i>	19
2. MATERIAIS E MÉTODOS	21
<i>Materiais</i>	21
<i>Equipamentos</i>	21
<i>Materiais Biológicos</i>	22
2.1. <i>Extração de DNA de amostras tumorais e de plasma de doentes com PDAC</i>	22
2.2. <i>Amplificação do exão 2 de KRAS das amostras tumorais e de plasma para posterior identificação de mutações por Sequenciação de Sanger</i>	23
2.3. <i>Eletroforese em Gel de Agarose</i>	24
2.4. <i>Identificação de mutações no codão 12 (exão 2) de KRAS por Sequenciação de Sanger</i> ...	25
2.5. <i>ARMS para deteção da mutação KRAS G12V</i>	25
2.6. <i>ARMS em Tempo Real para deteção da mutação KRAS G12V</i>	27
2.7. <i>ARMS/HRMA para deteção da mutação KRAS G12V em amostras tumorais de doentes com PDAC</i>	28
2.8. <i>ARMS/HRMA para deteção da mutação KRAS G12V em amostras de plasma de doentes com PDAC</i>	29

2.9. ARMS/HRMA para deteção da mutação KRAS G12D em amostras tumorais de doentes com PDAC	29
2.10. ARMS/HRMA para deteção da mutação KRAS G12D em amostras de plasma de doentes com PDAC	30
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
3.1. Quantificação e análise do DNA extraído de amostras tumorais e de plasma de doentes com PDAC	32
3.1.1. Amostras de DNA extraídas de tecido tumoral	33
3.1.2. Amostras de DNA extraídas de plasma	34
3.2. Amplificação e sequenciação do exão 2 de KRAS de amostras tumorais e de plasma para deteção de mutações no codão 12 do gene	34
3.3. Reação de ARMS para deteção da mutação KRAS G12V	37
3.3.1. Análise do primer G12V-específico utilizado na reação de ARMS para deteção da mutação KRAS G12V	37
3.3.2. Condições do ARMS para deteção da mutação KRAS G12V	39
3.3.3. Condições da reação de ARMS em Tempo Real	45
3.3.4. ARMS/HRMA para deteção da mutação KRAS G12V em amostras tumorais de doentes com PDAC	46
3.3.4.1. Protocolo de análise dos resultados de ARMS/HRMA para deteção da mutação KRAS G12V	54
3.3.5. ARMS/HRMA para deteção da mutação KRAS G12V em amostras de plasma de doentes com PDAC	54
3.4. ARMS/HRMA para deteção da mutação KRAS G12D	60
3.4.1. ARMS/HRMA para deteção da mutação KRAS G12D em amostras tumorais de doentes com PDAC	60
3.4.1.1. Protocolo de análise de ARMS/HRMA para deteção da mutação KRAS G12D	67
3.4.2. ARMS/HRMA para deteção da mutação KRAS G12D em amostras de plasma de doentes com PDAC	67
4. CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS	71
5. REFERÊNCIAS	75
6. APÊNDICE	79

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Representação simplificada da via de sinalização da proteína KRAS.	4
Figura 1.2. Componentes das biópsias líquidas para a detecção de biomarcadores de cancro em ctDNA..	7
Figura 1.3. Representação esquemática de uma reação de PCR em Tempo Real com recurso a corantes fluorescentes de ligação a dsDNA..	12
Figura 1.4. Princípio da técnica <i>Amplification Refractory Mutation System</i> (ARMS).	15
Figura 1.5. Princípio da técnica <i>High-Resolution Melting Analysis</i> (HRMA)..	17
Figura 1.6. Representação esquemática da técnica Sequenciação de Sanger.	19
Figura 3.1. Esquema sumário do projeto desenvolvido.	32
Figura 3.2. Quantificação e análise do DNA extraído de uma amostra tumoral e de plasma.....	33
Figura 3.3. Eletroforese em gel de agarose para análise da amplificação do exão 2 de <i>KRAS</i>	35
Figura 3.4. Análise da sequência do codão 12 de <i>KRAS</i> obtida por Sequenciação de Sanger.....	36
Figura 3.5. Esquematização do processo de otimização da reação de ARMS para detecção da mutação <i>KRAS</i> G12V.	40
Figura 3.6. Eletroforese em gel de agarose para análise do ARMS G12V-específico: Condição Temperatura de <i>annealing</i> 53 °C e Condição 2% DMSO.....	41
Figura 3.7. Eletroforese em gel de agarose para análise do ARMS G12V-específico: Condição temperatura de <i>annealing</i> 55 °C.....	42
Figura 3.8. Eletroforese em gel de agarose para análise do ARMS G12V-específico: Condição temperatura de <i>annealing</i> 55 °C/63 °C.	42
Figura 3.9. Eletroforese em gel de agarose para análise do ARMS G12V-específico: Condição redução do tempo de <i>annealing</i>	43
Figura 3.10. Eletroforese em gel de agarose para análise do ARMS G12V-específico: Condição redução do tempo de extensão..	43
Figura 3.11. Eletroforese em gel de agarose para análise do ARMS G12V-específico: Condição diferentes temperaturas de <i>annealing</i>	44
Figura 3.12. Eletroforese em gel de agarose para análise do efeito da adição de EvaGreen e NZYTaQ II 2x Green Master Mix à mistura de reação de ARMS..	46
Figura 3.13. HRMA dos resultados de ARMS para detecção da mutação <i>KRAS</i> G12V nas linhagens SW480, SW48 e nas amostras tumorais 12T, 13T, 18T e 46T de doentes com PDAC.....	49
Figura 3.14. HRMA dos resultados de ARMS para detecção da mutação <i>KRAS</i> G12V nas amostras tumorais 3T, 4T, 6T, 7T, 13T, 18T, 20T e 46T de doentes com PDAC.	51

Figura 3.15. HRMA dos resultados de ARMS para detecção da mutação <i>KRAS</i> G12V nas amostras de plasma 1P, 4P, 6P, 10P, 11P e 16P de doentes com PDAC.....	56
Figura 3.16. HRMA dos resultados de ARMS para detecção da mutação <i>KRAS</i> G12D na linhagem SW48 e nas amostras tumorais 6T, 7T, 8T, 11T, 23T e 46T de doentes com PDAC.....	62
Figura 3.17. Eletroforese em Gel de Agarose para análise do ARMS G12D-específico..	64
Figura 3.18. Análise das sequências do codão 12 de <i>KRAS</i> das amostras 7T, 8T e 23T obtidas por Sequenciação de Sanger.....	64
Figura 3.19. HRMA dos resultados de ARMS para detecção da mutação <i>KRAS</i> G12D na linhagem LS174T e nas amostras tumorais 3T, 8T, 13T, 18T, 20T, 30T e 46T de doentes com PDAC.	66
Figura 3.20. HRMA dos resultados de ARMS para detecção da mutação <i>KRAS</i> G12D nas amostras de plasma 1P, 6P, 7P, 11P, 23P, 28P e 48P de doentes com PDAC.....	69

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1. Tabela resumo das vantagens e desvantagens das técnicas <i>Amplification Refractory Mutation System (ARMS)</i> , <i>High-Resolution Melting Analysis (HRMA)</i> e Sequenciação de Sanger (SS) para análise mutacional de <i>KRAS</i>	11
Tabela 2.1. Caracterização das linhagens celulares SW48, SW480 e LS174T quanto à presença de mutações em <i>KRAS</i>	22
Tabela 2.2. Sequência dos <i>primers</i> utilizados para amplificação do exão 2 de <i>KRAS</i>	24
Tabela 2.3. Componentes da mistura de reação de PCR para amplificação do exão 2 de <i>KRAS</i>	24
Tabela 2.4. Programa da reação de PCR para amplificação do exão 2 de <i>KRAS</i>	24
Tabela 2.5. Sequência dos <i>primers</i> utilizados na reação de ARMS para detecção das mutações <i>KRAS</i> G12V e <i>KRAS</i> G12D.....	26
Tabela 2.6. Componentes da mistura da reação de ARMS: Condições iniciais e otimizadas.	26
Tabela 2.7. Programa da reação de ARMS: Condições iniciais e otimizadas.....	26
Tabela 2.8. Otimização da reação de ARMS para detecção da mutação <i>KRAS</i> G12V.....	27
Tabela 2.9. Condições testadas para a realização da reação de ARMS em Tempo Real: componentes da mistura da reação.....	28
Tabela 3.1. Tabela resumo dos resultados da sequenciação do codão 12 de <i>KRAS</i> das amostras tumorais.	36
Tabela 3.2. Tabela resumo dos resultados da sequenciação do codão 12 de <i>KRAS</i> das amostras de plasma.	37
Tabela 3.3. Hibridação do <i>primer</i> G12V-específico com diferentes alelos de <i>KRAS</i>	38
Tabela 3.4. Tabela resumo dos resultados obtidos por ARMS/HRMA para detecção da mutação <i>KRAS</i> G12V e <i>KRAS</i> G12D em amostras tumorais.....	53
Tabela 3.5. Comparação entre os resultados obtidos por SS e ARMS/HRMA para a detecção da mutação <i>KRAS</i> G12V em amostras tumorais e amostras de plasma correspondentes.	59
Tabela 3.6. Hibridação do <i>primer</i> G12D-específico com diferentes alelos de <i>KRAS</i>	60
Tabela 3.7. Comparação entre os resultados obtidos por SS e ARMS/HRMA para a detecção da mutação <i>KRAS</i> G12D em amostras tumorais e amostras de plasma correspondentes.	70
Tabela 6.1. Concentração do DNA extraído das amostras tumorais e de plasma.....	79

ABREVIATURAS

ARMS: *Amplification Refractory Mutation System*
CA 19-9: Antígeno carboidrato 19-9
CEA: Antígeno carcinoembrionário
cfDNA: DNA circulante livre de células
CT: Tomografia computadorizada
ctDNA: DNA tumoral circulante
ddNTPs: Didesoxirribonucleótidos trifosfatados
DMSO: Dimetilsulfóxido
dNTPs: Desoxirribonucleótidos trifosfatados
dsDNA: DNA em cadeia dupla
EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGFR: Recetor do fator de crescimento epidérmico
ESGE: *European Society of Gastrointestinal Endoscopy*
EUS-FNA: Ecoendoscopia com punção aspirativa por agulha fina
GAPs: Proteínas ativadoras da atividade GTPásica
gDNA: DNA genómico
GDP: Difosfato de guanosina
GEFs: Fatores de troca de guanina
GRB2: *Growth factor receptor-bound protein 2*
GTP: Trifosfato de guanosina
HRMA: *High-Resolution Desnaturalização Analysis*
KRAS: *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homologue*
MAPK: Proteínas quinases ativadas por mitogénios
MDR: Doença residual mínima
MRI: Ressonância magnética
NCCN: *National Comprehensive Cancer Network*
OH: Hidroxilo
OS: Sobrevivência global
PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida
PanIN: Neoplasia intraepitelial pancreática
PCR: *Polymerase Chain Reaction*
PDAC: Adenocarcinoma ductal pancreático

PI3K: Fosfatidilinositol 3-quinase

RFS: Sobrevida livre de recorrência

SOS: *Son of Sevenless*

SS: Sequenciamento de Sanger

TAE: Tris-acetato-EDTA

wt: *Wild-type*

INTRODUÇÃO

O cancro, considerado a doença do século XXI, representa a segunda principal causa de morte em todo o mundo, sendo por isso um dos maiores desafios da ciência e medicina moderna ¹.

1.1. Cancro do Pâncreas, um “assassino silencioso”

Na determinação das principais causas de morte por cancro no mundo, o cancro pancreático destaca-se como o cancro com a menor taxa de sobrevivência na Europa, o que reflete o mau e preocupante prognóstico associado a esta neoplasia ^{2,3}.

Cerca de 95% dos casos diagnosticados são do tipo adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC- do inglês *pancreatic ductal adenocarcinoma*), um tipo de tumor exócrino com origem nas células ductais que revestem os ductos pancreáticos responsáveis pela libertação dos sucos digestivos no duodeno ^{4,5}. Apesar de se poderem formar em qualquer região, cerca de 60% a 70% dos tumores pancreáticos são localizados na cabeça do pâncreas ⁴.

Quando diagnosticado numa fase precoce, a taxa de sobrevivência ao fim de 5 anos associada ao PDAC é de 20%, valor que decresce para 3% quando detetado num estadio avançado após metastização ⁶. A importância do diagnóstico precoce é refletida na diferença das taxas de sobrevivência, contudo, este apresenta desafios devido à ausência de sintomas nos estadios iniciais da doença, ou à presença de sintomas vagos e explicados por múltiplas patologias, como náuseas e enjoos, dor abdominal e na coluna dorsal, alterações nos hábitos intestinais e icterícia ^{3,4}.

Na maioria dos casos a doença progride na fase assintomática, levando a que aquando do diagnóstico 80% dos tumores se encontrem localmente avançados ou metastáticos, o que se traduz na descrição do cancro pancreático como um “assassino silencioso” ^{3,6}.

1.1.1. A identificação de biomarcadores como um dos principais desafios no diagnóstico e monitorização do PDAC

A medicina de precisão ocupa cada vez mais uma posição de destaque no que diz respeito ao tratamento oncológico por permitir personalizar os tratamentos e assim aumentar a probabilidade de sobrevivência. A sua aplicação tem por base as características genéticas de cada doente e visa a seleção de tratamentos dirigidos a alterações moleculares determinantes para o desenvolvimento de cancro. Tal como salientado pelo diretor do serviço de Oncologia Médica do Centro Hospitalar Lisboa Norte, para que esta abordagem terapêutica venha a substituir os tratamentos convencionais, como a quimioterapia,

no tratamento do cancro, é fundamental identificar essas alterações moleculares (biomarcadores), bem como abordagens para inibir a sua atividade ⁷.

A comparação da percentagem de casos diagnosticados tardiamente e da taxa de sobrevivência do PDAC salienta de forma impactante a importância da existência de um plano de rastreio oncológico eficaz. Deste modo, tal como destacado pela *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN), a identificação de biomarcadores para diagnóstico precoce do PDAC representa uma necessidade fulcral para a alteração do prognóstico associado a esta neoplasia ⁸.

Em adição à implementação de testes para rastreio e diagnóstico precoce, outro dos grandes desafios no contexto do PDAC diz respeito à monitorização da doença, visto que a recorrência do cancro após ressecção cirúrgica ocorre em cerca de 80% dos doentes com PDAC aparentemente localizado, o que se reflete na reduzida taxa de sobrevivência ao fim de 5 anos mesmo nos doentes diagnosticados precocemente ⁶. Assim, em adição à identificação de biomarcadores para diagnóstico, é de extrema importância identificar biomarcadores de prognóstico que permitam aos clínicos prever a progressão da doença e a recorrência, e deste modo contribuam para o avanço da medicina de precisão aplicada ao cancro pancreático.

1.2. O gene *KRAS* como potencial biomarcador do PDAC

O gene *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homologue* (*KRAS*), localizado na região cromossómica 12p12.1, codifica para uma pequena GTPase com 21,6 kDa, denominada *KRAS* ⁹.

A proteína *KRAS* encontra-se ciclicamente num estado ativo, quando ligada a trifosfato de guanósina (GTP - do inglês *guanosine triphosphate*), e inativo quando associada a difosfato de guanósina (GDP - do inglês *guanosine diphosphate*), funcionando assim como um interruptor molecular cuja ativação é responsável pela transdução de sinais extracelulares em sinais intracelulares que ativam diferentes vias de sinalização ^{10,11}. A transição entre o estado ativo e inativo de *KRAS* é catalisada por fatores de troca de guanina (GEFs - do inglês *guanine nucleotide exchange factor*), como a *son of sevenless* (SOS), e proteínas ativadoras da atividade GTPásica (GAPs - do inglês *GTPase-activating protein*). As GEFs promovem a troca de GDP por GTP e consequentemente as alterações conformacionais que resultam na ativação de *KRAS*, enquanto as GAPs estimulam a atividade hidrolítica de GTP intrínseca de *KRAS*, levando à sua inativação ^{11,12,13}.

A ativação extracelular de recetores celulares, como o recetor do fator de crescimento epidérmico (EGFR - do inglês *epidermal growth factor receptor*), pela ligação de ligandos, resulta na sua autofosforilação e dimerização, e no consequente recrutamento de proteínas adaptadoras. Estas, como a *growth factor receptor-bound protein 2* (GRB2), associam-se às GEFs que posteriormente estimulam a troca de GDP por GTP, levando à formação rápida e transitória de *KRAS*-GTP (Figura 1.1) ^{10,11,12}.

A alteração conformacional associada à ativação de *KRAS* possibilita a sua interação com mais de oitenta proteínas efetoras, iniciando assim a ativação de diversas vias de sinalização intracelular,

como a via das proteínas quinases ativadas por mitogénios (MAPK - do inglês *mitogen-activated protein kinase*) e a via da fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K - do inglês *phosphoinositide 3-kinase*), envolvidas na regulação de processos celulares como a proliferação, apoptose e angiogénese, bem como na regulação de alterações ao nível do citoesqueleto que interferem na adesão e migração celular. Finalizada a resposta ao estímulo, ocorre a hidrólise de GTP a GDP pela atividade hidrolítica intrínseca de KRAS, estimulada pela interação com GAPs (Figura 1.1) ^{10,11,12}.

Mutações *missense* no gene *KRAS* alteram o equilíbrio homeostático entre o estado ativo e inativo de KRAS, levam à sua estabilização no estado ativo (KRAS-GTP). Estas mutações comprometem a hidrólise de GTP, não só pela diminuição da atividade hidrolítica intrínseca de KRAS, mas também pela redução da sua interação com GAPs. Deste modo, as mutações resultam na ativação constitutiva de KRAS, persistentemente ligada a GTP, com consequente ativação desregulada (independente de estímulos externos) das vias de sinalização a jusante da proteína que promovem os processos celulares que determinam o desenvolvimento de cancro (Figura 1.1) ^{10,12}.

As mutações descritas são consideradas o maior evento molecular no cancro pancreático, uma vez que o gene *KRAS* representa o gene mais frequentemente mutado em PDAC, encontrando-se mutado em mais de 90% dos doentes ⁶. De acordo com a literatura, cerca de 98% das mutações pontuais em *KRAS* são detetadas nos codões 12, 13 ou 61 do gene, sendo as mutações no primeiro ou segundo nucleótido do codão 12 (exão 2) as mais comuns em PDAC por refletirem até 95% das mutações detetadas ^{9,10}. Estas mutações resultam na alteração do aminoácido glicina, codificado pelo codão GGT, por um ácido aspártico (GGT>GAT, G12D), uma valina (GGT>GTT, G12V) ou uma arginina (GGT>CGT, G12R), em 44%, 33% e 15% dos casos, respetivamente ¹⁰.

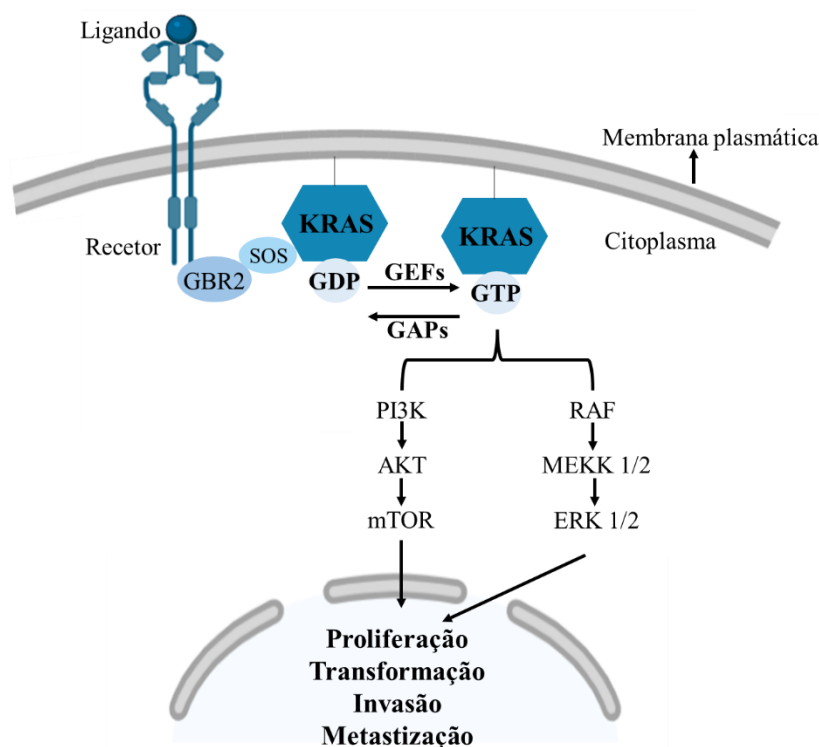


Figura 1.1. Representação simplificada da via de sinalização da proteína KRAS. A ativação de recetores pela ligação de ligandos, como fatores de crescimento, citocinas e hormonas, resulta no recrutamento de proteínas adaptadoras, como a *growth factor receptor-bound protein 2* (GRB2). Estas interagem com GEFs, como a *son of sevenless* (SOS), e, quando a proteína KRAS se encontra associada à membrana plasmática, estimulam a conversão de GDP a GTP, levando à ativação de várias vias de sinalização, como a via das proteínas quinases ativadas por mitogénios (MAPK) e a via da fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K). As vias de sinalização a jusante de KRAS estão envolvidas na regulação de diversos processos celulares como a proliferação, apoptose e angiogénese, bem como na regulação do citoesqueleto. A resposta ao estímulo extracelular é finalizada pela hidrólise de GTP a GDP pela atividade hidrolítica intrínseca de KRAS, acelerada pela interação com GAPs. Mutações em KRAS comprometem a transição de KRAS-GTP (estado ativo) para KRAS-GDP (estado inativo) através da diminuição da atividade hidrolítica intrínseca da proteína e da redução da sua interação com GAPs, levando à ativação constitutiva de KRAS. Deste modo, as vias de sinalização a jusante são constitutivamente ativadas, o que determina o desenvolvimento de cancro ^{10,11,12}. Criada com BioRender.com.

AKT: *protein kinase B*; ERK: *Extracellular signal-regulated kinase*; MEKK: *Mitogen-activated protein kinase kinase*; mTOR: *Mechanistic target of rapamycin*; RAF: *Rapidly accelerated fibrosarcoma*.

1.2.1. KRAS como potencial biomarcador para o diagnóstico do PDAC

O diagnóstico do cancro pancreático tem por base a realização de exames complementares de diagnóstico como a tomografia computadorizada (CT - do inglês *computed tomography*), a ressonância magnética (MRI - do inglês *magnetic resonance imaging*) e a ecoendoscopia (EUS - do inglês *endoscopic ultrasound*), que, por possibilitar a realização de uma biópsia aspirativa por agulha fina (FNA - do inglês *fine needle aspiration*), é um exame de extrema importância tendo em conta a necessidade da realização de uma biópsia para a obtenção de um diagnóstico definitivo. Deste modo, a ecoendoscopia com punção aspirativa por agulha fina (EUS-FNA - do inglês *endoscopic ultrasound-guided fine-needle*

aspiration) é atualmente considerado um exame extremamente útil no contexto do diagnóstico e estadiamento de PDAC ^{10,14}.

A sensibilidade da EUS-FNA varia entre 65% e 95%, e depende não só da experiência do operador, mas também da presença de regiões necróticas e ricas em estroma na massa tumoral, que resultam na redução da sensibilidade do exame. Outro dos aspetos a considerar diz respeito à percentagem de falsos negativos obtidos por EUS-FNA, entre 30% a 50%, assim como a obtenção de resultados inconclusivos em até 20% dos casos ^{10,15,16}.

As limitações descritas, em particular a obtenção de resultados inconclusivos e resultados negativos em casos em que a apresentação clínica é indicativa de cancro pancreático, constituem um problema por culminarem no atraso do diagnóstico ^{10,15}. Nesse sentido, é clara a necessidade da implementação de uma metodologia que permita dar resposta aos problemas apresentados, contribuindo assim para reduzir o atraso no diagnóstico e, consequentemente, para a melhoria do prognóstico.

Considerando os estudos presentes na literatura, a deteção de mutações em *KRAS* em amostras recolhidas através de EUS-FNA é possível e potencia a distinção entre lesões sólidas pancreáticas benignas e malignas, que se encontram usualmente associadas à presença de *KRAS wild-type* (wt) e à deteção de mutações no gene, respetivamente ^{17,18,19}. Neste sentido, a deteção de mutações em *KRAS* é indicativa de PDAC, especialmente quando associada a apresentação clínica, e, pelo contrário, amostras com *KRAS* wt são usualmente indicativas de doença benigna, como pancreatite crónica e pancreatite autoimune ^{10,20}.

De acordo com uma meta-análise de Fuccio et al. ¹⁸, a análise por citopatologia de amostras recolhidas através de EUS-FNA apresenta uma sensibilidade de 80,6% para o diagnóstico diferencial de PDAC, valor que aumenta para 88,7% quando combinada com a análise mutacional de *KRAS*. Adicionalmente, o estudo concluiu que a análise mutacional de *KRAS* em amostras inconclusivas por citopatologia resulta na redução da taxa de falsos negativos em 55,6%. Resultados concordantes foram obtidos por Bournet et al. ¹⁹ que reportou um aumento de 18% e 15% na sensibilidade e valor preditivo negativo, respetivamente, da citopatologia em combinação com a análise mutacional de *KRAS*, comparativamente à análise por citopatologia isoladamente. Deste modo, a deteção de uma mutação em *KRAS* em amostras inconclusivas por citopatologia em combinação com apresentação clínica e radiológica de PDAC, poderá evitar a repetição da EUS-FNA, recomendada pela *European Society of Gastro intestinal Endoscopy* (ESGE) nestes casos, permitindo antecipar a confirmação do diagnóstico e, caso aplicável, a realização de ressecção cirúrgica ^{18,20,21}.

Considerando os vários estudos que, com recurso a diferentes técnicas analisaram o potencial da análise mutacional de *KRAS* no diagnóstico diferencial de PDAC, é possível concluir que, apesar de o diagnóstico molecular não substituir a citopatologia, a sua realização resulta no aumento da sensibilidade no diagnóstico de PDAC comparativamente à análise por citopatologia isoladamente ^{10,18,20}. Assim, do ponto de vista clínico, a redução da taxa de falsos negativos e da necessidade de repetição da EUS-

FNA contribui para evitar atrasos na tomada de decisões terapêuticas e reduzir a perda de ressecabilidade cirúrgica do tumor devido a progressão da doença ¹⁰.

1.2.2. O potencial da análise mutacional de *KRAS* em ctDNA no PDAC

Atualmente na prática clínica os testes moleculares para análise de biomarcadores tumorais são maioritariamente realizados com recurso a amostras de tecido tumoral recolhidas durante uma cirurgia ou biópsia ^{1,9}. Ambos os procedimentos são invasivos e estão naturalmente associados a riscos, pelo que a sua implementação num plano de rastreio e deteção precoce de cancro, bem como de monitorização da doença, não é viável ¹.

Neste âmbito, devido à sua natureza pouco invasiva as biópsias líquidas estão atualmente a despertar cada vez mais interesse no âmbito do diagnóstico do cancro, mas também na monitorização da sua evolução ao longo do tratamento e na deteção de doença residual mínima (MRD - do inglês *minimal residual disease*) após ressecção cirúrgica. As biópsias líquidas têm por base a análise de biomarcadores em amostras biológicas de tecidos não sólidos obtidas maioritariamente de sangue, preferencialmente plasma, mas também de outros fluidos biológicos como urina e saliva ^{1,6}.

A existência de DNA circulante livre de células (cfDNA - do inglês *circulating cell-free DNA*) foi primeiramente descrita em 1948 por Mandel e Métais ²² no sangue de indivíduos saudáveis, tendo sido posteriormente concluído que doentes com cancro apresentam níveis aumentados de cfDNA ²³. O cfDNA é libertado pelas células tumorais através de apoptose, necrose ou secreção ativa, e contém mutações específicas das células neoplásicas, sendo por isso denominado DNA tumoral circulante (ctDNA - do inglês *circulating tumour DNA*) (Figura 1.2) ^{6,24,25}.

Através da análise do ctDNA as biópsias líquidas permitem obter mais informação sobre a heterogeneidade do tumor relativamente a uma biópsia de tecido tumoral, uma vez que permitem analisar os biomarcadores libertados por toda a massa tumoral primária e suas metástases ¹.

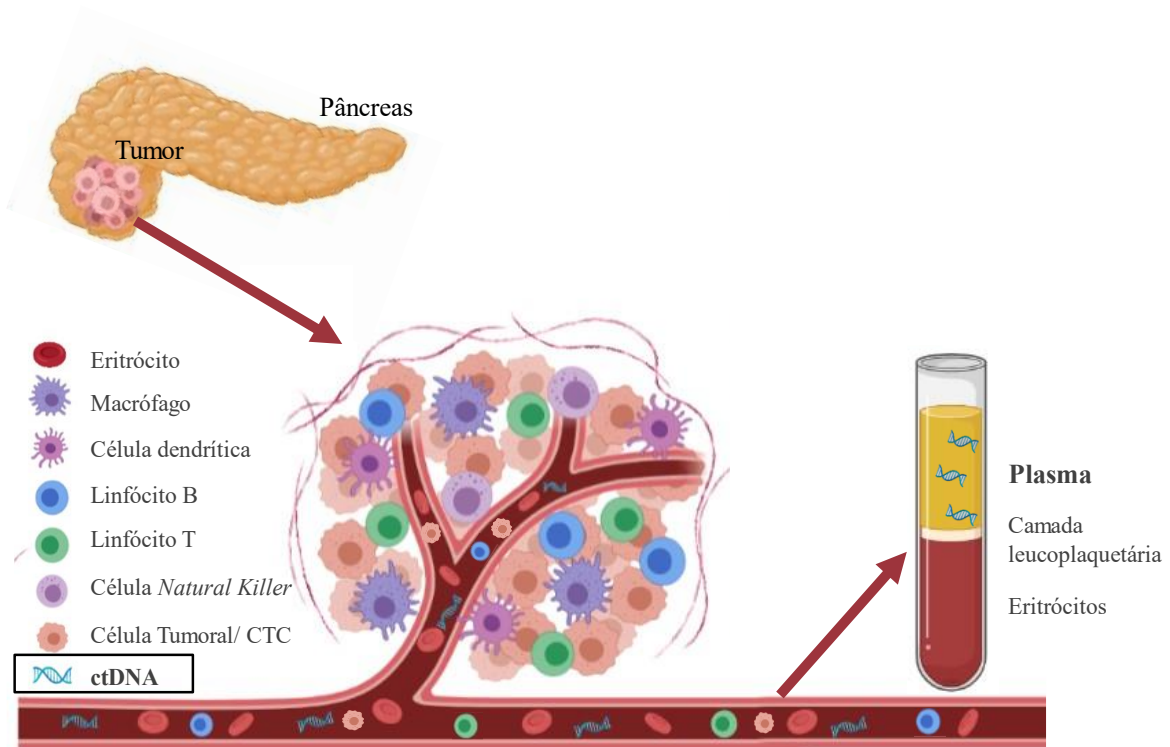


Figura 1.2. Componentes das biópsias líquidas para a detecção de biomarcadores de câncer em ctDNA. O ctDNA é libertado pelas células tumorais através de apoptose, necrose ou secreção ativa para a corrente sanguínea, de onde pode ser filtrado para a saliva e urina. Tendo em conta a ampla utilização das análises de sangue na prática clínica e a simplicidade da sua colheita, a análise de ctDNA presente no sangue, particularmente no plasma, representa uma das abordagens mais estudadas e com maior potencial no contexto da análise de biomarcadores através de biópsias líquidas para diagnóstico e monitorização do cancro ^{1,6}. Adaptada de “Tumor Microenvironment”, por BioRender.com (2021). Disponível em <https://app.biorender.com/biorender-templates>.
ctDNA: DNA tumoral circulante; CTC: Célula tumoral circulante.

1.2.2.1. KRAS como biomarcador para rastreio e diagnóstico precoce de PDAC

Adicionalmente à ausência de sintomas nos estadios iniciais da doença que levem os doentes a procurar apoio médico, outro dos fatores que contribui para o diagnóstico tardio de PDAC diz respeito à ausência de testes de rastreio eficazes.

Atualmente o melhor biomarcador para a deteção e monitorização do PDAC é o antígeno carboidrato 19-9 (CA 19-9). Porém, este apenas apresenta elevada sensibilidade (79% - 81%) e especificidade (82% - 90%) num estadio avançado da doença, geralmente quando os doentes já exibem sintomas, não tendo deste modo potencial para ser utilizado como biomarcador para rastreio e deteção precoce desta neoplasia ^{10,26}. Outra das limitações associadas à implementação do CA 19-9 como biomarcador universal no contexto do PDAC diz respeito aos resultados falsos negativos em doentes que, por apresentarem fenótipo Lewis negativo, observado em 5% a 10% da população, não sintetizam o antígeno CA 19-9 ²⁶. Deste modo, é urgente a necessidade da identificação de alterações moleculares que possibilitem a deteção precoce do PDAC e cuja análise possa ser incorporada num plano de rastreio oncológico.

Para além da sua aplicação no diagnóstico de PDAC juntamente com a análise por citopatologia, a análise mutacional de *KRAS* poderá apresentar potencial no âmbito do diagnóstico precoce do cancro pancreático, contribuindo assim para a melhoria do prognóstico a ele associado.

Mutações em *KRAS* são um dos primeiros eventos genéticos associados à carcinogénese pancreática, tal como evidenciado pela sua deteção em lesões pré-neoplásicas e precursoras comuns, tais como neoplasias intraepiteliais pancreáticas (PanIN – do inglês *pancreatic intraepithelial neoplasia*). Considera-se que, em geral, após a aquisição da primeira mutação oncogénica em *KRAS* decorre um período de dez a quinze anos até ao desenvolvimento de metástases, associadas a doença incurável, o que constitui uma janela de oportunidade para a deteção precoce de PDAC ^{10,27,28}. Deste modo, a deteção e análise de lesões pré-neoplásicas e precursoras no pâncreas poderá potenciar o diagnóstico de PDAC num estadio inicial da doença.

As técnicas de imagiologia disponíveis e atualmente utilizadas no diagnóstico de PDAC, como a MRI e CT, apresentam limitações por não permitirem detetar PanINs, apenas detetáveis através de procedimentos invasivos como a EUS ^{29,30}. Por outro lado, considerando que mutações no gene *KRAS* ocorrem cedo no desenvolvimento de PDAC, sendo detetadas em PanIN, a incorporação do estudo de *KRAS* em ctDNA através de biópsia líquida poderá ser vantajosa no rastreio desta neoplasia ^{10,27}.

De acordo com a literatura, a presença de mutações em *KRAS* em ctDNA é detetada em 30% a 68% dos doentes nos estadios iniciais de PDAC (tumor ressecável), valor que aumenta para 70% a 80% em doentes com PDAC localmente avançado ou metastático ¹⁷. Assim, apesar da elevada sensibilidade de algumas das técnicas atualmente disponíveis, é clara a dificuldade da análise mutacional de *KRAS* em ctDNA nos estadios iniciais da doença. Esta dificuldade deverá resultar da reduzida concentração de ctDNA em circulação, o que reflete o tamanho da massa tumoral e a ausência de metástases. Em adição, a sensibilidade e especificidade da análise mutacional de *KRAS* em ctDNA varia consoante a técnica de deteção utilizada ^{10,17}.

Apesar da informação presente na literatura indicar limitações na análise de *KRAS* em ctDNA para rastreio de PDAC, a análise do gene em conjunto com outros biomarcadores poderá ser promissora neste contexto. Um estudo realizado em 2017 com amostras de doentes com PDAC ressecável revelou o potencial da combinação da deteção de mutações em *KRAS* em ctDNA com a análise de quatro biomarcadores proteicos como metodologia de rastreio e deteção precoce de PDAC ³¹. Neste estudo, a deteção de mutações em *KRAS* isoladamente permitiu identificar 30% dos doentes, valor que aumentou para 64% quando em conjugação com a análise do antígeno carcinoembrionário (CEA), CA19.9, fator de crescimento de hepatócitos e osteopontina, tendo resultado numa especificidade de 99,5%.

Apesar dos avanços nas técnicas de diagnóstico molecular e na investigação em torno da análise de biomarcadores em ctDNA, em particular a análise de *KRAS* no contexto de PDAC, a quantidade de ctDNA presente nos fluídos biológicos nos estadios iniciais da doença permanece um desafio à implementação das biópsias líquidas na prática clínica no âmbito da deteção precoce de PDAC.

1.2.2.2. *KRAS* como biomarcador de prognóstico e preditivo de recorrência no PDAC

Atualmente a ressecção cirúrgica do tumor é a única opção de tratamento curativa para PDAC, no entanto, apenas cerca de 15% a 20% dos doentes são elegíveis para cirurgia, uma vez que a maioria apresenta PDAC localmente avançado ou metastático aquando do diagnóstico ⁴. Contudo, a recorrência do cancro permanece um dos grandes desafios no tratamento do PDAC, sendo detetadas metástases ao fim de 5 anos em 80% doentes com PDAC localizado mesmo após cirurgia de ressecção com margens de ressecção negativas ^{6,32}.

Após o procedimento cirúrgico, os doentes são monitorizados através de exames de imagiologia, nomeadamente CT, e através do biomarcador CA 19-9. ^{6,33}. Tal como na deteção de lesões pré-neoplásicas, esta é uma abordagem com precisão modesta para a deteção de recorrências, sendo, de acordo com alguns estudos, superada pela análise de ctDNA que aparenta possibilitar a deteção de metástases radiograficamente ocultas ^{34,35,36}.

No âmbito da medicina de precisão em PDAC é de extrema importância que os clínicos possuam a maior quantidade de informação possível no momento do diagnóstico de forma a identificarem os doentes com maior risco de recorrência, que beneficiaram de uma estratégia de monitorização mais apertada, e a definirem a estratégia terapêutica mais adequada a cada caso.

A deteção de mutações em *KRAS* em ctDNA anteriormente a ressecção cirúrgica encontra-se associada à redução do tempo médio de sobrevivência livre de recorrência (RFS - do inglês *relapse-free survival*) e da sobrevivência global (OS - do inglês *overall survival*) ^{6,32,37}. Neste sentido, a análise mutacional de *KRAS* em ctDNA poderá permitir identificar doentes com PDAC que beneficiariam de intensificação do tratamento antes e após o procedimento cirúrgico ^{33,38}.

Um estudo de Lee et al. ³² reportou a deteção de mutações em *KRAS* em ctDNA extraído de plasma em 62% dos doentes com PDAC ressecável anteriormente à cirurgia para ressecção tumoral. Em adição, o grupo observou que a recorrência do cancro ocorreu em 83% dos doentes, o que indica o potencial da análise mutacional de *KRAS* em ctDNA como biomarcador preditivo de recorrência no contexto pré-cirúrgico. Nesse sentido, alguns estudos sugerem que os doentes com PDAC ressecável para os quais é detetado ctDNA anteriormente a ressecção cirúrgica constituem um grupo de risco que poderá beneficiar de tratamento neoadjuvante ^{6,32}.

Neste âmbito, um estudo de Groot et al. ³⁶ revelou a presença de mutações em *KRAS* em ctDNA em 21% dos doentes que realizaram quimioterapia neoadjuvante em comparação com 69% na ausência de tratamento. De referir que todos os doentes submetidos a quimioterapia neoadjuvante, mas cuja deteção de ctDNA permaneceu, reincidiram após a cirurgia. De acordo com Yamaguchi et al. ³⁹, doentes com PDAC ressecável/ressecável borderline para os quais são detetadas mutações em *KRAS* em ctDNA anteriormente à ressecção cirúrgica, apresentam uma OS superior quando submetidos a quimioterapia ad-

juvante. Deste modo, a detecção de ctDNA no contexto pré-cirúrgico poderá igualmente indicar a necessidade de tratamento adjuvante com o intuito de melhorar a sobrevivência e, por outro lado, a não detecção poderá poupar os doentes a um regime de quimioterapia mais agressivo ³³.

O ctDNA apresenta um tempo de semi-vida curto, pelo que a sua detecção após ressecção cirúrgica é indicativa da presença de células tumorais, o que se reflete num risco elevado de recorrência ⁶. De acordo com a literatura, a detecção de mutações em *KRAS* em ctDNA após cirurgia apresenta uma sensibilidade e especificidade de cerca de 90% como biomarcador preditivo de recorrência, antecipando a sua detecção por exames de imagiologia ^{6,36}.

Assim, a análise mutacional de *KRAS* em ctDNA permite aos clínicos prever a recorrência do cancro e auxiliar na seleção da abordagem terapêutica mais adequada a cada doente, nomeadamente indicando a necessidade de tratamento neoadjuvante ou adjuvante nos casos em que ctDNA for detetado no contexto pré- ou pós-cirúrgico.

São várias as evidências que apontam para a relevância da análise mutacional de *KRAS* no diagnóstico de PDAC, bem como para o potencial do gene como biomarcador de prognóstico e preditivo de recorrência. Contudo, apesar das inúmeras potencialidades das biópsias líquidas para análise de ctDNA, a sua aplicação na prática clínica ainda apresenta limitações, particularmente devido à reduzida concentração de ctDNA presente em amostras biológicas. Deste modo, para que esta abordagem pouco invasiva seja mais amplamente incorporada na monitorização do PDAC, e especialmente na sua detecção em populações assintomáticas, é necessário que se façam avanços no desenvolvimento de técnicas com elevada sensibilidade e especificidade para a detecção de ctDNA ¹.

1.3. Análise mutacional de *KRAS*

Para além da identificação de alterações moleculares preponderantes no desenvolvimento de cancro, é igualmente essencial desenvolver testes de diagnóstico que permitam detetar essas alterações na prática clínica. Para tal, vários aspetos devem ser tidos em conta na seleção da técnica de detecção de mutações mais adequada, nomeadamente a sensibilidade, especificidade e limite de detecção da mesma, bem como a dificuldade de execução, tempo de resposta e custos associados ⁴⁰.

Atualmente existem várias técnicas que possibilitam a detecção de mutações no gene *KRAS* em amostras biológicas, sendo que a grande maioria se baseia na adaptação da *Polymerase Chain Reaction* (PCR), discutida seguidamente, ou na sua aplicação como passo inicial para amplificação da região do gene em estudo (maioritariamente o segundo exão).

A informação presente na Tabela 1.1 sumariza as principais características das técnicas *Amplification Refractory Mutation System* (ARMS), *High-Resolution Melting Analysis* (HRMA) e Sequenciação de Sanger (SS), que serão discutidas seguidamente por ordem decrescente do limite de detecção.

Tabela 1.1. Tabela resumo das vantagens e desvantagens das técnicas *Amplification Refractory Mutation System* (ARMS), *High-Resolution Melting Analysis* (HRMA) e Sequenciação de Sanger (SS) para análise mutacional de *KRAS*.

Técnica de testagem	Limite de detecção	Vantagens	Desvantagens	Referências
ARMS	~1%	Maior sensibilidade; Elevada especificidade.	Após vários ciclos da reação poderá ocorrer amplificação a partir de <i>primers mismatched</i> . Geralmente só deteta uma mutação específica por reação	9, 51, 53
HRMA	3-10%	Vantajosa para <i>screening</i> em larga escala; Dificuldade técnica reduzida.	Não permite genotipagem das amostras; Especificidade reduzida; Necessário confirmar os resultados positivos.	9, 40, 51, 55
SS	15-20%	Analisa toda a sequência amplificada.	Menor sensibilidade; Sensibilidade limitada em amostras com < 30% de células neoplásicas; Maior tempo de execução; Maior dificuldade técnica.	9, 40, 51, 59

ARMS: *Amplification Refractory Mutation System*; HRMA: *High-Resolution Melting Analysis*; SS: Sequenciação de Sanger.

PCR em Tempo Real

A PCR consiste numa técnica de amplificação exponencial de ácidos nucleicos que permite obter milhões de cópias de uma molécula de DNA através da realização de ciclos de temperatura ⁴¹. As diferentes temperaturas utilizadas em cada ciclo possibilitam a desnaturação das moléculas de DNA (Figura 1.3A), o *annealing* dos *primers* complementares à região a amplificar (Figura 1.3B) e, por último, a extensão do produto da reação pela DNA polimerase (Figura 1.3C).

Tradicionalmente a análise dos produtos obtidos nas reações de PCR requeria a realização de uma eletroforese em gel de agarose, necessidade que foi ultrapassada pela introdução da tecnologia do PCR em Tempo Real. O PCR em Tempo Real permite monitorizar as reações de PCR através da medição de fluorescência, uma vez que o aumento desta ao longo da reação é proporcional à quantidade de produto formado (Figura 1.3D) ⁴².

Atualmente existem várias tecnologias que possibilitam a detecção de fluorescência. A mais simples e económica diz respeito a moléculas cuja ligação a DNA em cadeia dupla (dsDNA, do inglês *double-stranded DNA*) resulta no aumento da fluorescência por elas emitida, doravante designadas corantes fluorescentes de ligação a dsDNA. Estes, apesar de facilmente adicionados a qualquer PCR, não permitem diferenciar produtos específicos de inespecíficos formados durante a reação ^{42,43}. Por outro

lado, existem tecnologias com elevada especificidade que se baseiam na utilização de sondas de oligonucleótidos marcadas com fluorescência cuja detecção depende da sua hidrólise, como as sondas *Taqman*, ou da sua hibridização com um produto de PCR específico, como os *molecular beacon* ^{42,44,45}.

O PCR em Tempo Real, por permitir monitorizar as reações de PCR, veio revolucionar o diagnóstico molecular, onde é amplamente aplicado em conjugação com outras técnicas por eliminar a necessidade da realização de um passo de análise adicional, reduzindo assim o tempo de obtenção de resultados (Figura 1.3) ⁴².

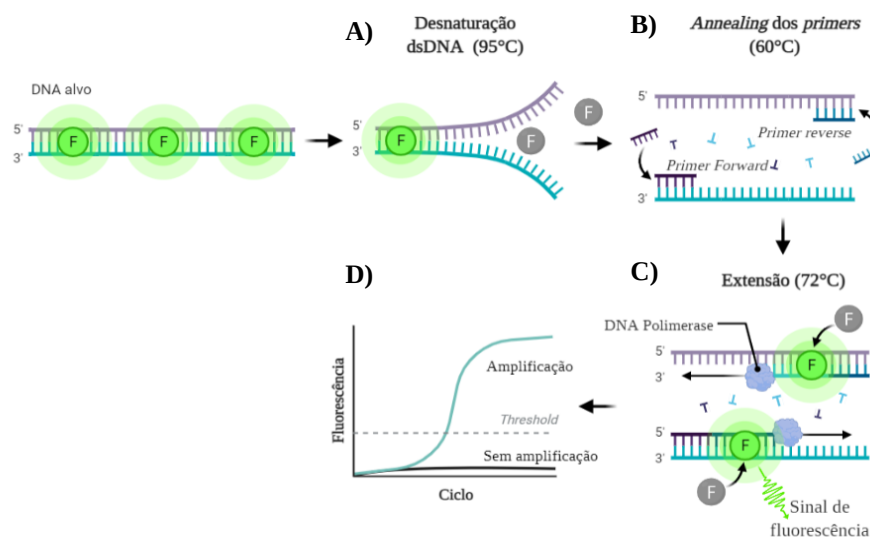


Figura 1.3. Representação esquemática de uma reação de PCR em Tempo Real com recurso a corantes fluorescentes de ligação a dsDNA. O PCR consiste na amplificação exponencial de ácidos nucleicos a partir de um DNA alvo através da realização de ciclos de temperatura que possibilitam (A) a desnaturação das moléculas de DNA, (B) o *annealing* dos *primers* complementares à região a amplificar e (C) a extensão do produto da reação pela DNA polimerase. O PCR em Tempo Real permite monitorizar as reações de PCR ao longo do curso da reação através da medição da fluorescência emitida (D). Uma das tecnologias utilizadas no PCR em Tempo Real diz respeito à utilização de corantes fluorescentes de ligação ao dsDNA. Ao longo da reação, em amostras contendo a sequência a amplificar, o corante irá associar-se às novas cadeias de dsDNA a ser sintetizadas (C) resultando no aumento da intensidade da fluorescência proporcionalmente à quantidade de produto de PCR formado ^{41,42,43}. Adaptada de “Fluorescent Dye-Based Tempo Real PCR”, por BioRender.com (2021). Disponível em <https://app.biorender.com/biorender-templates>.

dsDNA: DNA em cadeia dupla.

Amplification Refractory Mutation System (ARMS)

A combinação do PCR tradicional com outras técnicas moleculares, como a SS, possibilita a genotipagem de amostras biológicas e consequentemente o diagnóstico de doenças genéticas ⁴⁶.

De modo a tornar este processo mais simples e rápido, Newton et al. ⁴⁶ adaptaram o PCR de modo a que este, juntamente com a análise dos produtos de amplificação por eletroforese em gel de agarose, permi-

tisse identificar alterações em apenas um nucleótido de DNA sem a necessidade de sequenciar os produtos obtidos. A técnica descrita, denominada ARMS, permite não só genotipar determinado *locus*, mas também caracterizar os indivíduos em heterozigóticos e homozigóticos para qualquer um dos alelos em estudo (wt ou mutado) ⁴⁶.

O ARMS tem por base o desenvolvimento de condições de PCR que não resultem em amplificação quando na presença de um *primer* contendo um *mismatch* na região 3'. Em oposição ao PCR tradicional em que são utilizados dois *primers* na reação, a detecção de mutações pontuais por ARMS baseia-se na utilização de três *primers*, dois deles diferindo no nucleótido 3' e sendo por isso alelo-específicos (Figura 1.4A). O nucleótido 3' de um dos *primers* é complementar à sequência wt do gene em estudo, enquanto o outro é complementar à sequência que apresenta a mutação pontual em análise ⁴⁷.

Contudo, em inúmeros casos a presença de apenas um *mismatch* na região 3' não permite diferenciar amostras wt de amostras mutadas por resultar em amplificação em ambas. Uma das abordagens adotadas nestas situações passa pela inserção de um *mismatch* adicional na região 3' dos *primers* de modo a aumentar a especificidade das reações e permitir a genotipagem das amostras ⁴⁶.

A técnica ARMS requer a realização de duas reações de PCR independentes, nas quais são utilizados dois conjuntos de *primers* diferentes: um *primer* comum, complementar tanto à sequência wt como mutada, e um *primer* específico para um dos alelos (wt ou mutado). A realização das reações descritas em condições de PCR previamente otimizadas resulta em amplificação apenas nas reações em que o *primer* não comum não apresenta um *mismatch* com o DNA alvo no último nucleótido da região 3', ou seja, quando este é complementar à sequência da amostra em estudo ^{46,47}.

Finalizadas as reações os produtos são analisados por eletroforese em gel de agarose ⁴⁶. Em amostras de indivíduos heterozigóticos ocorre amplificação em ambas as reações, sendo por isso observadas duas bandas no gel de agarose (Figura 1.4B.3). Por outro lado, em amostras de indivíduos wt ou homozigóticos para a mutação em análise apenas irá ocorrer amplificação numa das reações, sendo por isso observada uma única banda no gel (Figura 1.4B.1 e 1.4B.2).

A realização de ambas as reações é apenas essencial quando no diagnóstico de determinada patologia a presença de um ou dois alelos mutados em determinado *locus* apresenta relevância na sua caracterização clínica. Todavia, para o rastreio da presença de determinada mutação apenas a reação com o *primer* complementar à sequência mutada é necessária ⁴⁷.

Com a evolução tecnológica as reações de ARMS passaram a ser realizadas em Tempo Real, deixando de ser necessário realizar uma eletroforese para análise dos produtos de amplificação. Deste modo, todo o processo é realizado num sistema fechado, o que não só é mais conveniente e rápido, mas também, por não ser necessário manipular os produtos de amplificação, reduz o risco de ocorrência de erros e contaminação ⁴⁸.

Atualmente encontra-se disponível um kit comercial, Therascreen KRAS Mutation Detection kit ⁴⁹ (DxS Ltd, Manchester, United Kingdom), baseado na técnica de ARMS em Tempo Real com *primers* Scorpion ⁵⁰, que possibilita a detecção das sete mutações mais prevalentes nos códons 12 e 13 do exão 2 de

KRAS (G12A, G12D, G12R, G12C, G12S, G12V, G13D). Esta técnica apresenta elevado potencial para diagnóstico, uma vez que se destaca pela sua elevada especificidade e sensibilidade, apresentado um limite de deteção de cerca de 1% ⁵¹. Desta forma, é claro o potencial da técnica de ARMS no contexto clínico para deteção e identificação de mutações em *KRAS*, o que é comprovado pelo uso do kit descrito em ensaios clínicos de fase III no âmbito do cancro colorretal ⁵².

Apesar de o ARMS ser extremamente vantajoso comparativamente a outras técnicas quando se consideram os parâmetros especificidade, sensibilidade e tempo de obtenção do resultado, é importante ter em conta que, apesar de ocorrer em menor extensão, a DNA Polimerase pode iniciar a amplificação a partir de *primers* contendo *mismatches*, resultando em resultados falsos positivos ⁹. Em adição, a não ser que seja desenvolvida numa abordagem *multiplex* (vários *primers* alelo-específicos), cada reação de ARMS apenas permite detetar a presença de uma mutação. Esta limitação obriga à realização de múltiplas reações em casos em que mais do que uma mutação se encontra associada a uma patologia, como é o caso das mutações em *KRAS* no contexto de PDAC ⁵³.

A)

	<i>KRAS wt</i>	<i>KRAS mutado</i>
<i>Primer Forward wt</i>	$\begin{array}{c} \leftarrow \text{ T } \underline{\text{C}} \text{ CAGCGT } \dots 5' \\ 5' \dots \text{ TTGCTTAACGTCGCA } \dots 3' \end{array}$	$\begin{array}{c} \leftarrow \text{ T } \underline{\text{C}} \text{ CAGCGT } \dots 5' \\ 5' \dots \text{ TTGCTTAGCGTCGCA } \dots 3' \end{array}$
<i>Primer Forward mutado</i>	$\begin{array}{c} \leftarrow \text{ C } \underline{\text{C}} \text{ CAGCGT } \dots 5' \\ 5' \dots \text{ TTGCTTAACGTCGCA } \dots 3' \end{array}$	$\begin{array}{c} \leftarrow \text{ C } \underline{\text{C}} \text{ CAGCGT } \dots 5' \\ 5' \dots \text{ TTGCTTAGCGTCGCA } \dots 3' \end{array}$

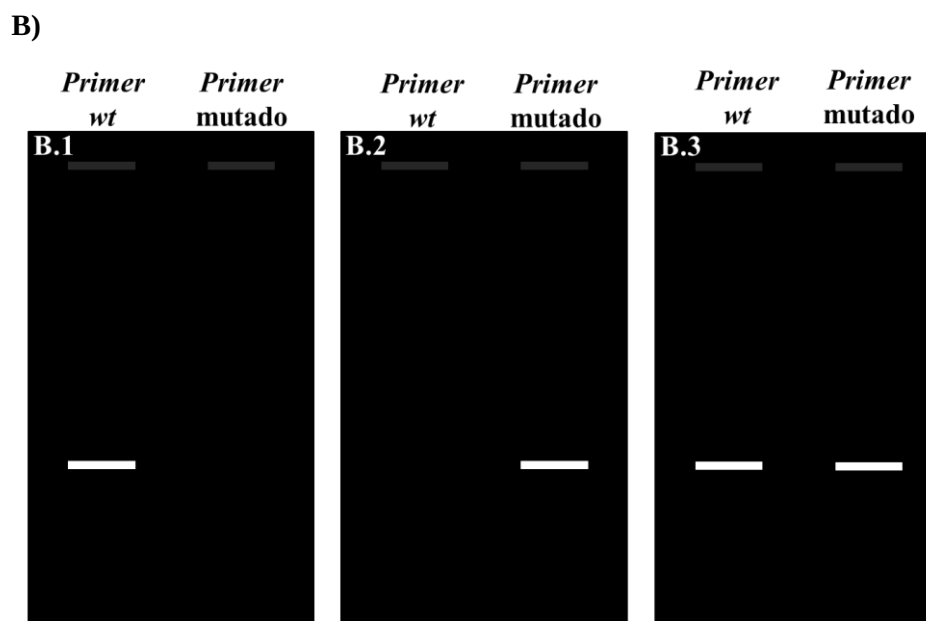


Figura 1.4. Princípio da técnica *Amplification Refractory Mutation System* (ARMS). (A) A detecção de mutações pontuais por ARMS baseia-se na utilização de três *primers*, dois deles diferindo apenas no nucleótido 3' (alelo-específicos). O nucleótido 3' do *primer wt* é complementar à sequência wt do gene em estudo, enquanto o *primer mutado* é complementar à sequência que apresenta a mutação pontual em análise. A introdução de um *mismatch* adicional na região 3' dos *primers* alelo-específicos permite aumentar a especificidade das reações. Num ARMS tradicional são realizadas duas reações de PCR nas quais são utilizados dois conjuntos de *primers* diferentes: um *primer* comum e um *primer* específico para um dos alelos (wt ou mutado), que determina a ocorrência ou não de amplificação. (B) Os produtos das reações são analisados por eletroforese em gel de agarose. Nas amostras de indivíduos homozigóticos wt (B.1) ou homozigóticos para a mutação em estudo (B.2) só se observa uma banda no gel correspondente à reação com o *primer wt* e mutado, respetivamente. Em amostras de indivíduos heterozigóticos são observadas duas bandas no gel, uma vez que ocorre amplificação em ambas as reações (B.3) ^{46,47}.
 wt: *wild-type*.

High-Resolution Melting Analysis (HRMA)

Tal como anteriormente referido, uma das abordagens para detecção de fluorescência em reações de PCR em Tempo Real diz respeito à utilização de corantes fluorescentes de ligação a dsDNA. Estes, por intercalarem com qualquer produto de cadeia dupla, resultam tanto na detecção de produtos especí-

ficos como inespecíficos, nomeadamente dímeros de *primers* ⁴². Desta forma, caso a reação não apresente elevada especificidade não é possível assegurar que o aumento de fluorescência resulte da formação do produto pretendido, o que se traduz na necessidade da execução de técnicas adicionais para validação dos resultados ^{42,54}.

Com base nesta limitação surge a HRMA que possibilita a distinção dos produtos de amplificação através da análise das suas curvas de desnaturação, que refletem o seu tamanho e sequência ⁵⁴. Esta técnica tem por base a desnaturação seguida de renaturação rápida dos produtos de PCR na presença de corantes fluorescentes de ligação a dsDNA, e posterior desnaturação dos mesmos pelo aumento gradual de temperatura (Figura 1.5A) ^{9,55}. Durante a rápida renaturação das cadeias de DNA são formados dois tipos de heteroduplexes e dois tipos de homoduplexes nas amostras heterozigóticas, e homoduplexes nas amostras de indivíduos homozigóticas para cada um dos alelos (Figura 1.5B). A desnaturação final dos duplexes traduz-se na diminuição da fluorescência, que ocorre mais rapidamente em amostras heterozigóticas, uma vez que, devido à presença de *mismatches* nos duplexes, apresentam uma temperatura de desnaturação mais baixa (Figura 1.5C). Do mesmo modo, a análise do perfil de desnaturação de amostras homozigóticas para diferentes alelos deverá permitir a sua diferenciação devido a diferenças na temperatura de desnaturação dos produtos correspondentes ⁹.

Deste modo, a amplificação por PCR em Tempo Real de uma região de um gene contendo mutações pontuais, como o exão 2 de *KRAS*, na presença de um corante fluorescente de ligação a dsDNA, e a posterior análise do produto obtido por HRMA, possibilita a identificação de amostras contendo mutações clinicamente relevantes em determinado *locus*.

A HRMA é uma técnica que se destaca nos parâmetros tempo de resposta, custo, bem como dificuldade técnica, o que potencia a sua aplicação em clínica. Esta apresenta, de acordo com a literatura, um limite de deteção entre 3% e 10% para deteção de mutações no exão 2 de *KRAS*, inferior ao ARMS mas superior à SS ^{40,51,55}. Contudo, a HRMA apenas permite realizar *screening* de mutações, visto que a análise do perfil de desnaturação permite diferenciar amostras mutadas e wt, mas não nomear a mutação detetada (genotipar). Assim, as amostras caracterizadas como mutadas por HRMA requerem uma análise complementar com recurso a outra técnica para identificação da mutação e confirmação do resultado ^{40,55}.

A importância da confirmação dos resultados positivos (amostras mutadas) obtidos por HRMA é fundamentada nos problemas de especificidade atribuídos à técnica, tal como demonstrado pela taxa de falsos positivos superior a 20% reportada por Franklin et al. ⁵¹. Esta limitação é explicada pela possibilidade de qualquer mutação na região analisada, mesmo sem relevância clínica, poder resultar num perfil de desnaturação distinto do wt, dando origem a resultados equívocos.

Considerando todos os aspetos associados à HRMA, esta destaca-se pelo seu potencial para *high throughput screening* de mutações, no entanto, quando o objetivo é diagnosticar uma patologia, nomeadamente PDAC, a necessidade da realização de outra técnica, usualmente SS, para confirmação do resultado e genotipagem das amostras mutadas acresce ao custo e tempo de resposta ^{9,51}.

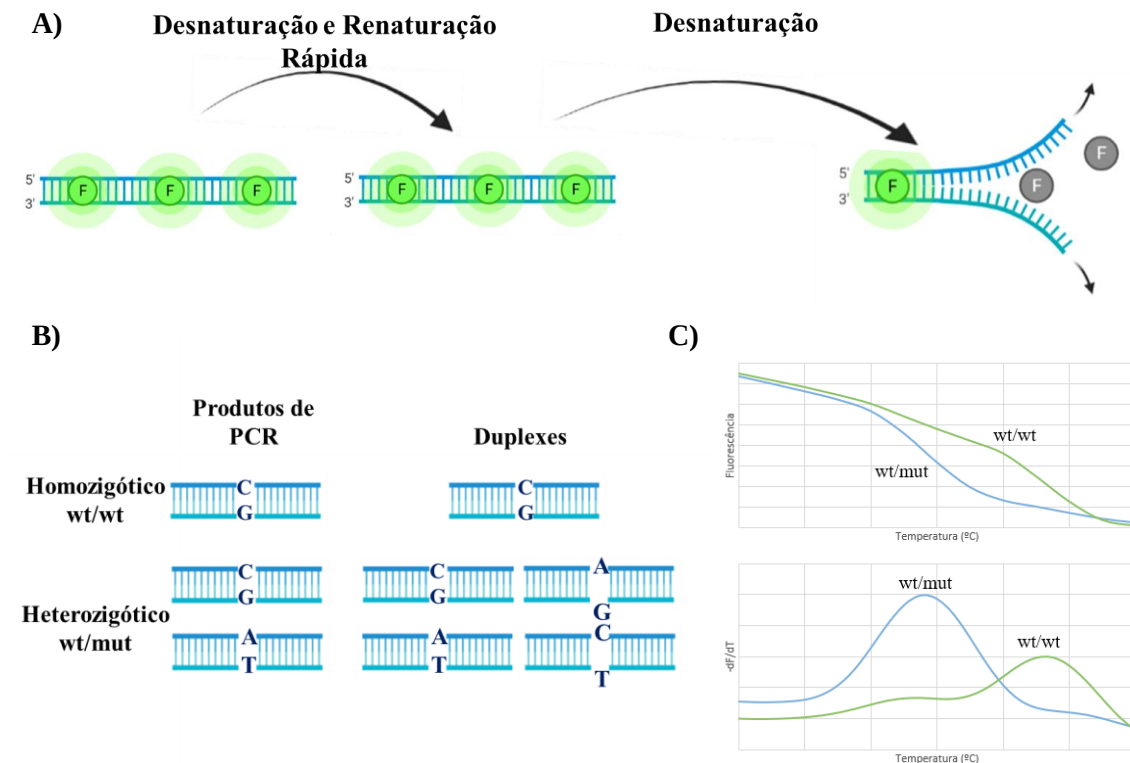


Figura 1.5. Princípio da técnica *High-Resolution Melting Analysis (HRMA)*. (A) Uma região de um gene contendo uma mutação pontual associada ao desenvolvimento de cancro é amplificada por PCR em Tempo Real na presença de um corante fluorescente de ligação a dsDNA. Os produtos de PCR sofrem desnaturação seguida de renaturação rápida e nova desnaturação pelo aumento gradual de temperatura. (B) Durante a rápida renaturação são formados dois tipos de heteroduplexes e dois tipos de homoduplexes nas amostras heterozigóticas wt/mut, e homoduplexes nas amostras homozigóticas wt/wt. (C) A HRMA permite obter o perfil de desnaturação de cada amostra. A desnaturação final dos duplexes resulta na diminuição da fluorescência, que, devido à presença de *mismatches* nos duplexes, ocorre mais rapidamente em amostras heterozigóticas - temperatura de desnaturação mais baixa^{9,55}. Criada com BioRender.com.
wt: Alelo *wild-type*; mut: Alelo mutado.

Sequenciação de Sanger (SS) - *gold standard*

A SS consiste na síntese de DNA complementar pela DNA polimerase na presença de dideoxirribonucleótidos trifosfatados (ddNTPs, do inglês *dideoxynucleotides triphosphates*), análogos dos desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs, do inglês *deoxyribonucleotide triphosphates*) que, por não apresentarem um grupo hidroxilo (OH) na posição 3' que permita a formação de uma ligação fosfodiéster com o dNTP seguinte, resultam na terminação da síntese de DNA. Deste modo, através da incorporação aleatória de ddNTPs durante a extensão pela DNA polimerase são obtidos múltiplos fragmentos de DNA de tamanhos díspares com diferentes ddNTPs terminais (Figura 1.6)^{56,57,58}.

Tradicionalmente a SS quereria a realização de quatro reações em paralelo contendo um dos quatro ddNTPs, e a análise manual dos fragmentos de DNA obtidos por eletroforese em gel de poliácridamida (PAGE, do inglês *polyacrylamide gel electrophoresis*) de acordo com o seu padrão de migração

no gel ^{57,58}. Posteriormente foram feitas alterações à técnica que simplificaram a sua execução por permitirem que esta seja realizada numa única reação contendo simultaneamente os quatro ddNTPs marcados com diferentes fluoróforos.

A SS automatizada baseia-se na separação por eletroforese capilar dos fragmentos de DNA marcados com diferentes ddNTPs e na sua análise através de um sistema de deteção. Este, através da excitação do fluoróforo dos ddNTP de cada fragmento por um laser, e consequente emissão de fluorescência de quatro cores diferentes (correspondentes a cada ddNTP), permite a determinação da sequência de DNA em estudo pela análise do cromatograma obtido (Figura 1.6) ⁹.

Quando se pretende realizar a genotipagem de uma amostra a SS é sem dúvida uma das técnicas disponíveis mais relevantes, uma vez que, após a realização de um PCR para amplificação da região a genotipar, permite analisar toda a sequência e assim detetar a presença de múltiplas mutações pontuais, mas também pequenas inserções e deleções ^{9,40}. Deste modo, amplificando a região do exão 2 de *KRAS*, que contem os codões maioritariamente mutados em PDAC (codões 12 e 13), é possível identificar a presença de múltiplas mutações nesta região simultaneamente.

Contudo, apesar de ser um dos métodos mais amplamente utilizados para deteção de mutações, esta apresenta um limite de deteção modesto de 15% a 20% e consideravelmente inferior a outras técnicas atualmente disponíveis ^{40,51}. Os resultados presentes na literatura sugerem que a SS poderá gerar resultados falsos negativos quando utilizada para a análise mutacional de *KRAS* em amostras de tecido contendo menos do que 30% de células tumorais ^{59,60}. Nesse sentido, de acordo com dois estudos que avaliaram a robustez da SS na deteção de mutações em *KRAS* em cancro colorretal, a utilização do ARMS TheraScreen kit referido anteriormente aumentou a taxa de amostras mutadas em 12% ⁵⁹ e 17% ⁵¹ comparativamente à SS.

Desta forma, a informação presente na literatura evidencia a sensibilidade limitada da SS na análise de mutações em *KRAS* em amostras com pouca quantidade de células neoplásicas e referentes a tumores nos estadios iniciais, o que limita o seu potencial no contexto do diagnóstico precoce de PDAC. Ainda assim, a SS é por muitos considerada a técnica *gold standard* para deteção de mutações, sendo amplamente utilizada como referência para confirmação dos resultados obtidos por outras técnicas, como é o caso da HRMA ^{9,55}.

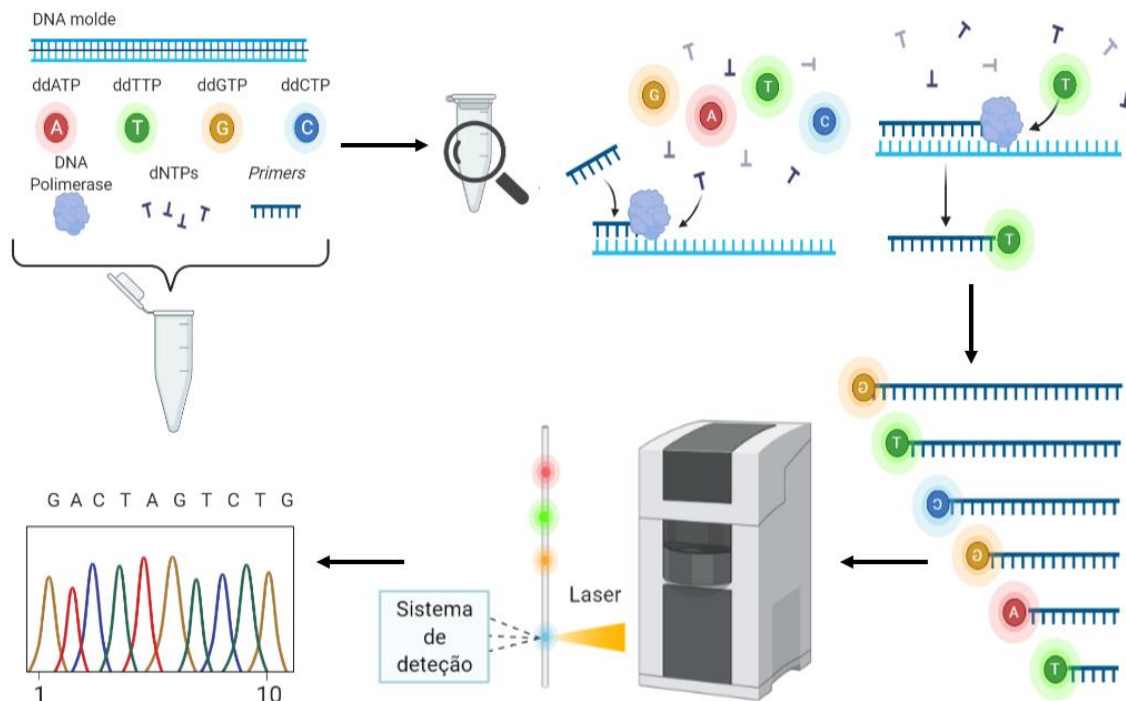


Figura 1.6. Representação esquemática da técnica Sequencição de Sanger. A SS é uma técnica amplamente utilizada com o intuito de determinar a sequência de regiões de DNA específicas previamente amplificadas por PCR. Para tal, é realizada uma reação de amplificação de DNA contendo todos os reagentes de um PCR (dNTPs, *primer forward* e *primer reverse*, DNA polimerase) e o DNA molde, bem como ddNTPs marcados com diferentes fluoróforos. Durante a extensão das novas cadeias de DNA pela DNA polimerase, a incorporação de um ddNTP em substituição a um dNTP resulta na terminação da síntese devido à ausência de um grupo OH na região 3'. No final são obtidos múltiplos fragmentos de DNA de tamanhos díspares com diferentes ddNTPs terminais, que são analisados por eletroforese capilar. Através da excitação do fluoróforo de cada fragmento por um laser e consequente emissão de fluorescência de quatro cores diferentes (correspondentes a cada ddNTP) é obtido um cromatograma que permite determinar a sequência de DNA em estudo^{9,56,57}. Adaptada de “Sanger Sequencing”, por BioRender.com (2021). Disponível em <https://app.biorender.com/biorender-templates>.

1.4. Contexto e Objetivo da Tese

O PDAC representa atualmente a quarta principal causa de morte por cancro no mundo, e a taxa de mortalidade a ele associada não tem revelado uma tendência decrescente ao longo dos anos. Na realidade, é estimado que na ausência de avanços significativos na gestão desta neoplasia, esta se torne a segunda principal causa de morte por cancro na Europa até 2030^{6,61}.

Para melhorar o prognóstico do PDAC é fundamental identificar biomarcadores para diagnóstico e monitorização da doença, concomitantemente ao desenvolvimento de metodologias para a sua caracterização. Ao analisar a informação presente na literatura o gene *KRAS* destaca-se como um potencial

biomarcador de PDAC, tanto ao nível do diagnóstico precoce, como na antecipação de recorrência e monitorização da progressão da doença.

Deste modo, este projeto teve como principal objetivo o desenvolvimento de uma nova metodologia para deteção das duas mutações mais prevalentes, G12D e G12V, no gene *KRAS* em PDAC em amostras de tumores primários e plasmas. Nesse sentido, foi desenvolvida uma estratégia de amplificação alelo-específica (ARMS) acoplada a HRMA, designada ARMS/HRMA.

Para tal, o trabalho desenvolvido foi dividido nas seguintes etapas:

- Seleção de um *primer* *KRAS* G12V-específico;
- Otimização de uma reação de ARMS em Tempo Real para deteção da mutação *KRAS* G12V com recurso a material genómico controlo;
- Seleção da técnica HRMA como metodologia de análise dos produtos formados na reação de ARMS de modo a aumentar a especificidade da reação: Estratégia ARMS/HRMA;
- Validação da estratégia ARMS/HRMA para deteção da mutação *KRAS* G12V com recurso a amostras tumorais e de plasma de doentes com PDAC;
 - Extração de DNA de amostras tumorais e de plasma;
 - Amplificação do exão 2 de *KRAS*;
 - Sequenciação do exão 2 de *KRAS*;
 - Análise da sequência do codão 12 de *KRAS*.
- Seleção de um *primer* *KRAS* G12D-específico;
- Validação da estratégia ARMS/HRMA para deteção da mutação *KRAS* G12D com recurso a amostras tumorais e de plasma de doentes com PDAC.

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais

- Ácido acético (Merck, Darmstadt, Alemanha);
- Ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (Chem Lab nv, Zedelgem, Bélgica);
- Agarose (NzyTech, Lisboa, Portugal);
- Dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA);
- dNTPs NZYMix (NzyTech, Lisboa, Portugal);
- EvaGreen Dye 20x (Biotium, Fremont, Califórnia, EUA);
- GelRed® Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, Fremont, Califórnia, EUA);
- GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA);
- High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, Basileia, Suíça);
- Isopropanol (Chem Lab nv, Zedelgem, Bélgica);
- NZY M-MuLV First-Strand cDNA Synthesis Kit (NzyTech, Lisboa, Portugal);
- NZYSpeedy qPCR Green Master Mix (2x) (NzyTech, Lisboa, Portugal);
- NZYTaq II 2x Green Master Mix (NzyTech, Lisboa, Portugal);
- NZYTaq II DNA polymerase, respectivo *buffer* 10x e solução de MgCl₂ 50 mM (NzyTech, Lisboa, Portugal);
- Tris Base (Fisher BioReagents, Pittsburgh, Pennsylvania, EUA).

Equipamentos

- Balança Digital;
- Bloco de Aquecimento (Amadora, Portugal);
- Corbett Rotor-Gene 6000 (Qiagen, Hilden, Alemanha);
- Cuba de Eletroforese (Bio-Rad, Hercules, Califórnia, EUA);
- GelDoc™ EZ Imager (Bio-Rad, Hercules, Califórnia, EUA);
- Microcentrífuga Mini Star (Amadora, Portugal);
- NanoDrop (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, EUA);
- PowerPac™ Basic Power Supply (Bio-Rad, Hercules, Califórnia, EUA);
- Speed Vac Concentrator (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA);
- Termociclador DNA Engine® (Bio-Rad, Hercules, Califórnia, EUA);

Materiais Biológicos

No trabalho desenvolvido foi utilizado DNA genómico (gDNA) cedido pela Doutora Marília Cravo e Doutora Bárbara Mourão do Hospital Beatriz Ângelo de três linhagens celulares, duas delas com diferentes mutações no codão 12 de *KRAS*, e uma wt para o mesmo codão. As suas características encontram-se descritas abaixo e na Tabela 2.1 ⁶².

- Linhagem celular SW480 (ATCC® CCL-228™) correspondente a células imortalizadas do cólon de um doente do sexo masculino de 50 anos com adenocarcinoma colorretal;
- Linhagem celular SW48 (ATCC® CCL-231™) correspondente a células imortalizadas do cólon de um doente do sexo feminino de 82 anos com adenocarcinoma colorretal;
- Linhagem celular LS174T (ATCC® CL-188™) correspondente a células imortalizadas do cólon de um doente do sexo feminino de 58 anos com adenocarcinoma colorretal.

Em adição, foram utilizadas amostras clínicas de plasma (38 amostras) e tumores primários (48 amostras) de doentes com PDAC cedidas pela Doutora Marília Cravo e Doutora Bárbara Mourão do Hospital Beatriz Ângelo com o consentimento informado e autorização ética dos doentes.

Tabela 2.1. Caracterização das linhagens celulares SW48, SW480 e LS174T quanto à presença de mutações em *KRAS*.

Linhagem	Mutação <i>KRAS</i>	
SW48	wt	Homozigótica
SW480	G12V	Homozigótica
LS174T	G12D	Heterozigótica

2.1. Extração de DNA de amostras tumorais e de plasma de doentes com PDAC ^a

A extração de DNA das amostras tumorais e de plasma foi realizada com recurso ao High Pure PCR Template Preparation Kit de acordo com os protocolos descritos seguidamente para o isolamento de ácidos nucleicos a partir de tecido e sangue de mamíferos, respetivamente.

Isolamento de ácidos nucleicos a partir de amostras tumorais:

Adicionar 25 mg - 50 mg de tecido, 200 µL de *Tissue Lysis Buffer* e 40 µL de Proteinase K a um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL, doravante designado *ependorf*, misturar imediatamente e incubar

^a Procedimento realizado em colaboração com a estudante de doutoramento Ana Beatriz Oliveira do laboratório de Nanomedicina, DCV, FCT-NOVA.

a 55 °C durante 1 hora ou até que os tecidos estejam completamente digeridos. Adicionar 200 µL de *Binding Buffer*, misturar imediatamente e incubar a 70 °C durante 10 minutos.

Isolamento de ácidos nucleicos a partir de amostras de plasma:

Adicionar 200 µL de plasma, 200 µL de *Binding Buffer* e 40 µL de Proteinase K a um *ependorf*, misturar imediatamente e incubar a 70 °C durante 10 minutos.

Os passos descritos seguidamente são comuns a ambos os isolamentos.

Adicionar 100 µL de isopropanol e misturar. Neste passo remover partículas insolúveis de tecido com recurso a uma ponta de pipeta descartável (amostras tumorais). Após a montagem do tubo *High Pure Filter* num tubo coletor, pipetar a amostra no reservatório do tubo *High Pure Filter* e centrifugar a 8000 xg durante 1 minuto. Após centrifugação, descartar e substituir o tubo coletor, adicionar 500 µL de *Inhibitor Removal Buffer* ao reservatório do tubo, centrifugar a 8000 xg durante 1 minuto e descartar o sobrenadante. Adicionar 500 µL de *Wash Buffer* ao reservatório do tubo, centrifugar a 8000 xg durante 1 minuto e descartar o sobrenadante. Após repetição do procedimento anterior, centrifugar a montagem por 10 segundos na velocidade máxima e descartar o tubo coletor.

Por último, para eluição do DNA, inserir o tubo *High Pure Filter* num novo *ependorf* estéril, adicionar 50 µL para amostras de tecido e 30 µL para amostras de plasma de *Elution Buffer* pré-aquecido a 70 °C ao reservatório do tubo e centrifugar a 8000 xg durante 1 minuto.

A concentração do DNA extraído das amostras tumorais e plasmas foi determinada com recurso ao NanoDrop.

2.2. Amplificação do exão 2 de *KRAS* das amostras tumorais e de plasma para posterior identificação de mutações por Sequenciação de Sanger ^a

Com o intuito de analisar a presença de mutações no codão 12 de *KRAS* nas amostras tumorais e de plasma de doentes com PDAC foi realizada uma reação de PCR para amplificação do exão 2 do gene.

Os *primers* utilizados na reação, cujas sequências se encontram na Tabela 2.2, foram previamente selecionados pela estudante de doutoramento Ana Beatriz Oliveira do laboratório de Nanomedicina, DCV, FCT-NOVA.

As condições de preparação das reações encontram-se descritas na Tabela 2.3, tendo sido realizadas num volume final de 20 µL. As reações foram realizadas a partir de 50 ng de DNA extraído das amostras tumorais e de 5 ng a 119 ng de DNA no caso das amostras de plasma, de acordo com a quantidade de DNA extraído para cada amostra (2 µL do DNA extraído para 20 µL de mistura de reação). As reações foram realizadas no Termociclador DNA Engine® segundo o programa de reação descrito na Tabela 2.4.

Para as amostras de plasma foram realizadas quatro reações de amplificação independentes para cada amostra, que foram posteriormente concentradas com recurso ao Speed Vac Concentrator, e ressuspensas em 15 µL de água de PCR.

Tabela 2.2. Sequência dos *primers* utilizados para amplificação do exão 2 de *KRAS*.

Primer Forward	5´ GGTGGAGTATTTGATAGTGTA 3´
Primer Reverse	5´ TGGACCCTGACATACTCCCAAG 3´
Tamanho do amplificação	402 pb

Tabela 2.3. Componentes da mistura de reação de PCR para amplificação do exão 2 de *KRAS*.

	<u>Concentração Final</u>
Água PCR	-
Buffer (10x)	1x
MgCl₂ (50 mM)	2 mM
dNTP Mix (10 mM)	0,8 mM
Primer Forward (10 µM)	0,12 µM
Primer Reverse (10 µM)	0,12 µM
NZYTaq II DNA Polimerase (5U/µL)	0,15 U/µL

Tabela 2.4. Programa da reação de PCR para amplificação do exão 2 de *KRAS*.

Desnaturação Inicial	95 °C	5 min	1 ciclo
Desnaturação	95 °C	30 s	
Annealing dos primers	61 °C */53 °C **	30 s	30 ciclos
Extensão	72 °C	20 s	

* Amostras tumorais; ** Amostras de plasma.

2.3. Eletroforese em Gel de Agarose

Os produtos das reações de PCR para amplificação do exão 2 de *KRAS* foram analisados com recurso a Eletroforese em Gel de Agarose. Para tal, foram preparados géis de agarose 1% em Tris-acetato- EDTA (TAE) 1x (40 mM Tris, 20 mM ácido acético e 1 mM EDTA) para visualização por Gel Red. A eletroforese foi realizada a 90V durante 1 hora, e o resultado observado no GelDoc™ EZ Imager. Foi utilizado como marcador molecular o GeneRuler 100 bp DNA Ladder.

O mesmo procedimento foi seguido para análise dos produtos das reações de ARMS, tendo para tal sido preparados géis de agarose 1,5% em TAE 1x. A eletroforese foi realizada a 90V durante 1 hora e 30 minutos.

2.4. Identificação de mutações no codão 12 (exão 2) de *KRAS* por Sequenciação de Sanger

Os produtos da amplificação do exão 2 de *KRAS* das amostras tumorais e de plasma (secção 2.2) foram sequenciados na STABVIDA (Setúbal, Portugal) e os cromatogramas analisados para detecção de mutações no codão 12 do gene *KRAS*.

2.5. ARMS para detecção da mutação *KRAS* G12V

Com o intuito de detetar a mutação *KRAS* G12V em amostras tumorais e de plasma foi otimizada uma reação de ARMS.

Os *primers* utilizados na reação, cujas sequências se encontram na Tabela 2.5, foram previamente selecionados pelo investigador Pós-Doc Bruno Veigas e pela estudante de doutoramento Ana Beatriz Oliveira do laboratório de Nanomedicina, DCV, FCT-NOVA.

Por se tratar de uma reação de amplificação alelo-específica o nucleótido na posição 3' (nucleótido 20) do *primer forward* é complementar apenas ao alelo G12V de *KRAS* (Tabela 2.5). Em adição, de modo a aumentar a eficiência da diferenciação entre amostras com e sem a mutação G12V, o *primer* apresenta um nucleótido degenerado na posição anterior (nucleótido 19). Por outro lado, o *primer reverse* não apresenta degeneração e não é alelo-específico.

Como ponto de partida foram testadas as condições de reação descritas nas Tabelas 2.6 e 2.7, correspondentes aos componentes e ao programa da reação iniciais, respetivamente. As reações foram realizadas no termociclador DNA Engine®, e foram preparadas num volume final de 10 µL, com recurso a 40 ng de gDNA das linhagens SW480 e SW48, homozigóticas G12V e wt, respetivamente.

Seguidamente, a partir das condições iniciais descritas, foi realizado um processo de otimização da reação no sentido de aumentar a eficiência de amplificação na linhagem SW480, favorecida pelo *primer forward*, relativamente à linhagem SW48. O processo de otimização teve como base a modificação das condições do programa de reação, tendo sido também testado o efeito da adição de DMSO à mistura de reação.

Para cada um dos parâmetros otimizados foram testados diferentes valores de modo a estabelecer as condições mais favoráveis para a diferenciação entre a linhagem wt/wt e G12V/G12V, bem como minimizar a formação de dímeros de *primers*. As várias condições testadas encontram-se sumarizadas na Tabela 2.8, tendo cada uma sido analisada com base na observação dos produtos de amplificação por eletroforese em gel de agarose (secção 2.3).

Após o processo de otimização descrito, as condições selecionadas para a reação de ARMS (condição 10, Tabela 2.8) foram as descritas nas Tabelas 2.6 e 2.7, correspondentes aos componentes e ao programa otimizados, respectivamente.

Tabela 2.5. Sequência dos *primers* utilizados na reação de ARMS para detecção das mutações *KRAS* G12V e *KRAS* G12D.

Primer Forward G12V	5' CTTGTGGTAGTTGGAGCTTT 3'
Primer Forward G12D	5' CTTGTGGTAGTTGGAGCTTA 3'
Primer Reverse	5' CTCTATTGTTGGATCATATTCG 3'
Tamanho do amplicão	96 pb

N: Nucleótido degenerado; **N**: Nucleótico alelo-específico.

Tabela 2.6. Componentes da mistura da reação de ARMS: Condições iniciais e otimizadas.

	Concentração Final	
	Condições iniciais	Condições otimizadas
Água PCR	-	-
DMSO (15%)	-	2%
Buffer (10x)	1x	1x
MgCl ₂ (50 mM)	2 mM	2 mM
dNTP Mix (10 mM)	0,4 mM	0,4 mM
Primer Forward (10 µM)	0,3 µM	0,3 µM
Primer Reverse (10 µM)	0,3 µM	0,3 µM
NZYTaq II Polimerase (5 U/µL)	0,5 U/µL	0,5 U/µL

Tabela 2.7. Programa da reação de ARMS: Condições iniciais e otimizadas.

	CI	CO	CI	CO	CI	CO
Desnaturação Inicial	95 °C	95 °C	5 min	5 min	1 ciclo	1 ciclo
Desnaturação	95 °C	95 °C	30 s	30 s	30 ciclos	10 ciclos
Annealing	53 °C	52 °C *	45 s	15 s		
Extensão	72 °C	72 °C	30 s	10 s		
Desnaturação	-	95 °C	-	30 s	-	20 **
Annealing	-	60°C	-	45 s		ciclos
Extensão	-	72 °C	-	10 s		

CI: Condição inicial; CO: Condição otimizada; *54°C para *KRAS* G12D; ** 25 ciclos para 4 ng de DNA.

Tabela 2.8. Otimização da reação de ARMS para detecção da mutação *KRAS* G12V.

Condição	1 ^a Ta	Tempo de <i>annealing</i>	Ciclos	2 ^a Ta	Tempo de <i>annealing</i>	Ciclos	Tempo de extensão (72°C)	DMSO
1	53°C	45s	30	-	-	-	30s	-
2	53°C	45s	30	-	-	-	30s	2%
3	55°C	45s	30	-	-	-	30s	2%
4	55°C	45s	10	63°C	45s	20	30s	2%
5	55°C	15s	10	63°C	45s	20	30s	2%
6	55°C	45s	10	63°C	15s	20	30s	2%
7	55°C	15s	10	63°C	45s	20	10s	2%
8	55°C	15s	10	60°C	45s	20	10s	2%
9	57°C	15s	10	63°C	45s	20	10s	2%
10	52°C	15s	10	60°C	45s	20	10s	2%
11	57°C	15s	10	60°C	45s	20	10s	2%

Ta: Temperatura de *annealing*.

2.6. ARMS em Tempo Real para detecção da mutação *KRAS* G12V

Com o intuito de prever o resultado da realização da reação de ARMS em Tempo Real na presença de um corante fluorescente de ligação a dsDNA: EvaGreen Dye 20x e NZYTaQ II 2x Green Master Mix, foram testadas as condições descritas na Tabela 2.9.

As misturas de reação foram preparadas num volume final de 10 µL com cerca de 40 ng de gDNA das linhagens SW480 e SW48. As reações foram realizadas no termociclador DNA Engine® segundo o programa previamente otimizado (Tabela 2.7) e analisadas por eletroforese em gel de agarose (secção 2.3).

De acordo com os resultados obtidos foi selecionada a condição 2 (Tabela 2.9), utilizada posteriormente para a preparação de todas reações de ARMS para detecção das mutações *KRAS* G12V e *KRAS* G12D.

Tabela 2.9. Condições testadas para a realização da reação de ARMS em Tempo Real: componentes da mistura da reação.

	Concentração Final	
	Condição 1	Condição 2
Água PCR	-	-
DMSO (15%)	2%	2%
Buffer (10x)	1x	-
MgCl ₂ (50 mM)	2 mM	-
dNTP Mix (10 mM)	0,4 mM	-
Primer Forward (10 µM)	0,3 µM	0,3 µM
Primer Reverse (10 µM)	0,3 µM	0,3 µM
NZYTaq II Polimerase (5 U/µL)	0,5 U/µL	-
EvaGreen 20x	1x	-
NZYTaq II 2x Green Master Mix (2x)	-	1x

2.7. ARMS/HRMA para detecção da mutação *KRAS* G12V em amostras tumorais de doentes com PDAC

As reações de ARMS foram acopladas a HRMA, tendo para tal sido adicionado ao programa da reação um passo de desnaturação de 45 °C a 95 °C, a 0,2 °C/s. As condições de preparação das reações encontram-se descritas na Tabela 2.9- condição 2, e estas foram realizadas no Corbett Rotor-Gene 6000 segundo o programa descrito na Tabela 2.7. As misturas de reação foram preparadas num volume final de 10 µL contendo cerca de 4 ng de gDNA das linhagens SW480 e SW48, controlos da reação, bem como das amostras tumorais a analisar.

Após a realização das reações de ARMS/HRMA estas foram analisadas com recurso ao Rotor-Gene 6000 Series Software 1.7 (Qiagen, Hilden, Alemanha) para obtenção dos valores de fluorescência em função da temperatura (HRMA), assim como os valores da derivada negativa da fluorescência (F) em relação à temperatura (T) (-dF/dT) em função da temperatura para cada amostra- curva de desnaturação. Adicionalmente, de forma a acentuar as diferenças entre genótipos, foi subtraída a curva de desnaturação da linhagem wt/wt SW48, definida como referência, às curvas de desnaturação das restantes amostras, sendo assim obtidas as curvas de diferença. Esta análise foi realizada com recurso ao programa Microsoft Excel.

O mesmo procedimento foi repetido num total de quarenta e cinco amostras tumorais de doentes com PDAC previamente analisadas por SS (secção 2.4), tendo sido utilizadas em todas as reações as linhagens SW480 e SW48 como controlo mutado e wt, respetivamente, sendo a segunda selecionada como referência para a obtenção das curvas de diferença.

2.8. ARMS/HRMA para detecção da mutação *KRAS* G12V em amostras de plasma de doentes com PDAC

Para a detecção da mutação *KRAS* G12V em amostras de plasmas previamente caracterizadas por SS foi seguido o mesmo procedimento descrito anteriormente para análise das amostras tumorais (secção 2.7).

As reações foram realizadas com 4 ng de DNA de dezasseis amostras de plasma previamente caracterizadas por SS quanto à presença de mutações no codão 12 de *KRAS*. Em todas as reações foram utilizados como controlos as linhagens celulares SW480 e SW48, sendo a segunda selecionada como referência para a obtenção das curvas de diferença.

2.9. ARMS/HRMA para detecção da mutação *KRAS* G12D em amostras tumorais de doentes com PDAC

No seguimento do desenvolvimento de uma reação de ARMS/HRMA para a detecção da mutação *KRAS* G12D, o processo foi repetido para a mutação *KRAS* G12D, uma vez que é a mutação mais comum em PDAC.

Para tal, foi selecionado um *primer forward* G12D-específico que difere do *primer* utilizado para a mutação G12V apenas no último nucleótido na posição 3', que é alelo específico, e cuja sequência se encontra na Tabela 2.5. A reação de ARMS/HRMA foi inicialmente realizada nas condições otimizadas para a mutação G12V (Tabela 2.7 e 2.9- condição 2), com recurso a 4 ng de gDNA da linhagem celular SW48, bem como de seis amostras tumorais previamente caracterizadas por SS quanto à presença de mutações no codão 12 de *KRAS*.

Após a realização das reações de ARMS/HRMA, estas foram analisadas com recurso ao Rotor-Gene 6000 Series Software 1.7 para obtenção dos valores de fluorescência em função da temperatura (HRMA), assim como os valores da derivada negativa da fluorescência (F) em relação à temperatura (T) (-dF/dT) em função da temperatura para cada amostra- curva de desnaturação. De forma a acentuar as diferenças entre genótipos, foi subtraída a curva de desnaturação da linhagem wt/wt SW48, definida como referência, às curvas de desnaturação das restantes amostras, sendo assim obtidas as curvas de diferença.

Adicionalmente, as reações foram analisadas por eletroforese em gel de agarose (secção 2.3), tendo esta revelado a formação de produtos inespecíficos, pelo que a primeira temperatura de *annealing* foi aumentada de 52°C para 54°C (Tabela 2.7). Considerando o resultado obtido, foi analisada a complementaridade dos *primers* utilizados na reação com o genoma humano com recurso à ferramenta Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

O mesmo procedimento foi repetido num total de quarenta e quatro amostras tumorais de doentes com PDAC previamente caracterizadas por SS (secção 2.4), tendo sido utilizadas as linhagens LS174T e SW48 como controlo mutado e wt, respetivamente, sendo a segunda selecionada como referência para a obtenção das curvas de diferença.

2.10. ARMS/HRMA para deteção da mutação *KRAS* G12D em amostras de plasma de doentes com PDAC

Para a deteção da mutação *KRAS* G12D em amostras de plasmas previamente caracterizadas por SS foi seguido o mesmo procedimento descrito anteriormente para a análise das amostras tumorais (secção 2.9).

As reações foram realizadas com 4 ng de DNA de dezasseis amostras de plasma previamente analisadas por SS quanto à presença de mutações no codão 12 de *KRAS*. Em todas as reações foram utilizados como controlos as linhagens celulares LS174T e SW48, sendo a segunda selecionada como referência para a obtenção das curvas de diferença.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este projeto teve como objetivo o desenvolvimento de uma nova metodologia para o diagnóstico e monitorização do PDAC. As principais etapas realizadas encontram-se esquematizadas na Figura 3.1 e os resultados obtidos serão apresentados e discutidos ao longo desta secção.

Mutações *missense* no gene *KRAS* são detetadas em mais de 90% dos doentes, tornando-se num potencial biomarcador de PDAC. As mutações *KRAS* G12D e *KRAS* G12V dizem respeito às mutações mais frequentemente detetadas nesta neoplasia, sendo detetadas em 44% e 33% dos doentes, respetivamente ¹⁰.

Para melhorar o prognóstico do PDAC é necessário identificar biomarcadores para diagnóstico e monitorização da doença, concomitantemente ao desenvolvimento de metodologias para a sua deteção. Nesse sentido, o trabalho desenvolvido teve como objetivo o desenvolvimento de uma nova metodologia para a deteção das mutações *KRAS* G12D e *KRAS* G12V.

Tendo em conta que as mutações descritas são mutações *missense*, caracterizadas pela alteração de um único nucleótido no codão 12 (exão 2) de *KRAS*, optou-se por realizar a sua deteção com recurso a uma amplificação alelo-específica (ARMS) em Tempo Real. O ARMS foi a técnica selecionada uma vez que, tal como apresentado na secção 1.3, possibilita a deteção de mutações pontuais pela utilização de *primers* alelo-específicos que resultam na amplificação seletiva do alelo que se pretende detetar. No ARMS convencional, os produtos da reação são analisados por eletroforese, contudo, de modo a eliminar a necessidade da realização de um método de análise adicional, optou-se por realizar o ARMS em Tempo Real. Esta decisão é justificada pela importância do tempo de resposta na prática clínica, em particular no âmbito da confirmação do diagnóstico do PDAC, que impacta o início do tratamento, e consequentemente o prognóstico.

Primeiramente foi otimizada uma reação de ARMS G12V-específica com recurso a linhagens celulares, no sentido de aumentar a eficiência de amplificação da linhagem G12V/G12V, favorecida pelo *primer forward* G12V-específico selecionado, relativamente à linhagem wt/wt. Para aumentar a especificidade da metodologia desenvolvida, optou-se por associar o ARMS à técnica de HRMA e caracterizar as amostras com base na análise do perfil de desnaturação dos produtos formados na reação (ARMS/HRMA).

A estratégia de ARMS/HRMA foi validada com recurso a amostras tumorais e de plasma de doentes com PDAC. Considera-se que, em geral, a SS é a técnica de referência para análise mutacional, pelo que se procedeu à amplificação e sequenciação do exão 2 de *KRAS* das amostras para deteção de mutações no codão 12 do gene. Os resultados obtidos foram comparados aos de ARMS/HRMA.

Por último, as amostras foram analisadas para detecção da mutação *KRAS* G12D de acordo com o protocolo de ARMS/HRMA previamente otimizado e com recurso a um novo *primer forward* G12D-específico.

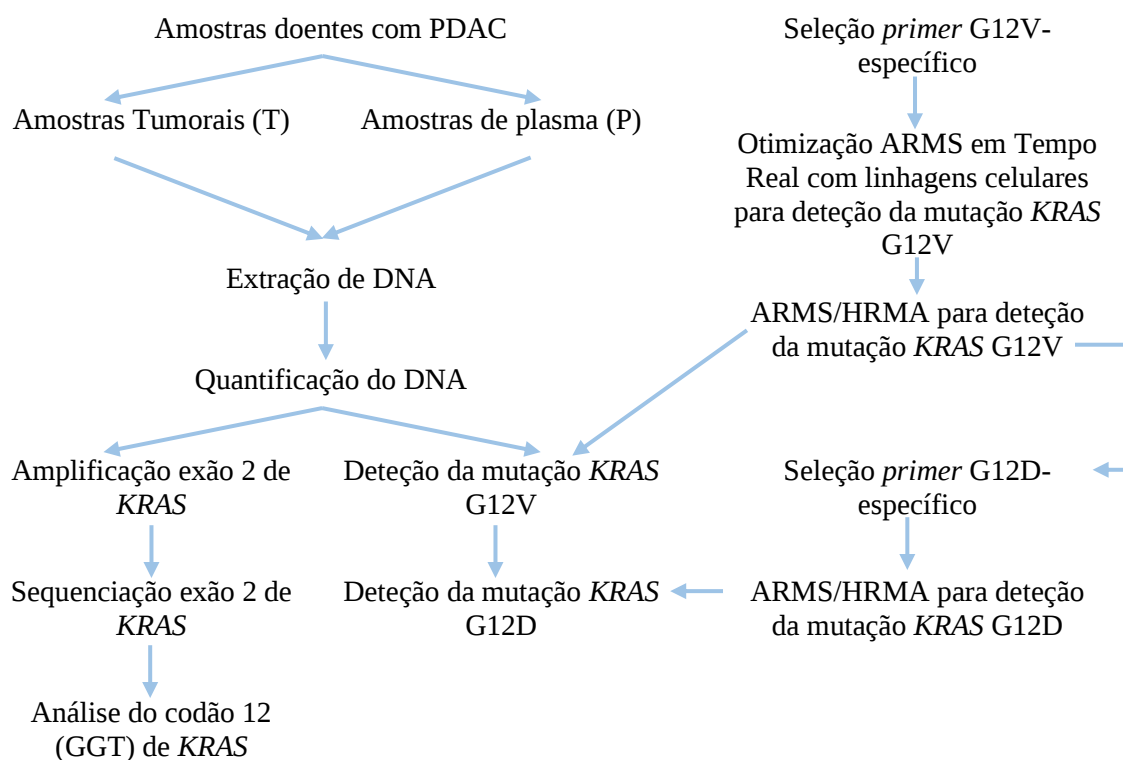


Figura 3.1. Esquema sumário do projeto desenvolvido.

3.1. Quantificação e análise do DNA extraído de amostras tumorais e de plasma de doentes com PDAC

Neste projeto foram utilizadas amostras de quarenta e oito doentes com PDAC, tendo sido extraído DNA de quarenta e oito amostras de tecido tumoral primário e trinta e oito amostras de plasma. A concentração de DNA extraído foi obtida com recurso ao NanoDrop e, tal como expectável, foi superior quando obtida de amostras tumorais comparativamente a amostras de plasma, tendo resultado numa concentração média de 162 ng/μL (entre 5,1 ng/μL e 912,0 ng/μL) e 20,5 ng/μL (entre 2,5 ng/μL e 59,4 ng/μL) para amostras tumorais e de plasma, respetivamente. A quantidade média de DNA extraído, calculada através da multiplicação da concentração de DNA pelo volume de eluição utilizado na extração (tumores: 50 μL; plasma: 30 μL) foi de 8,1 μg (entre 0,3 μg e 45,6 μg) e 0,6 μg (entre 0,08 μg e 1,8 μg) de DNA para amostras tumorais e de plasma, respetivamente.

A Figura 3.2 diz respeito aos espectros de absorvância de DNA extraído de uma amostra tumoral (T) (Figura 3.2A) e de plasma (P) (Figura 3.2B), bem como as respetivas concentrações e razões entre

as absorvâncias 260/280 (Abs 260/280) e 260/230 (Abs 260/230) (Figura 3.2C). As duas amostras selecionadas representam resultados ilustrativos típicos para a maioria das amostras. A concentração do DNA extraído das restantes amostras encontra-se sumariada na Tabela 6.1 (Apêndice).

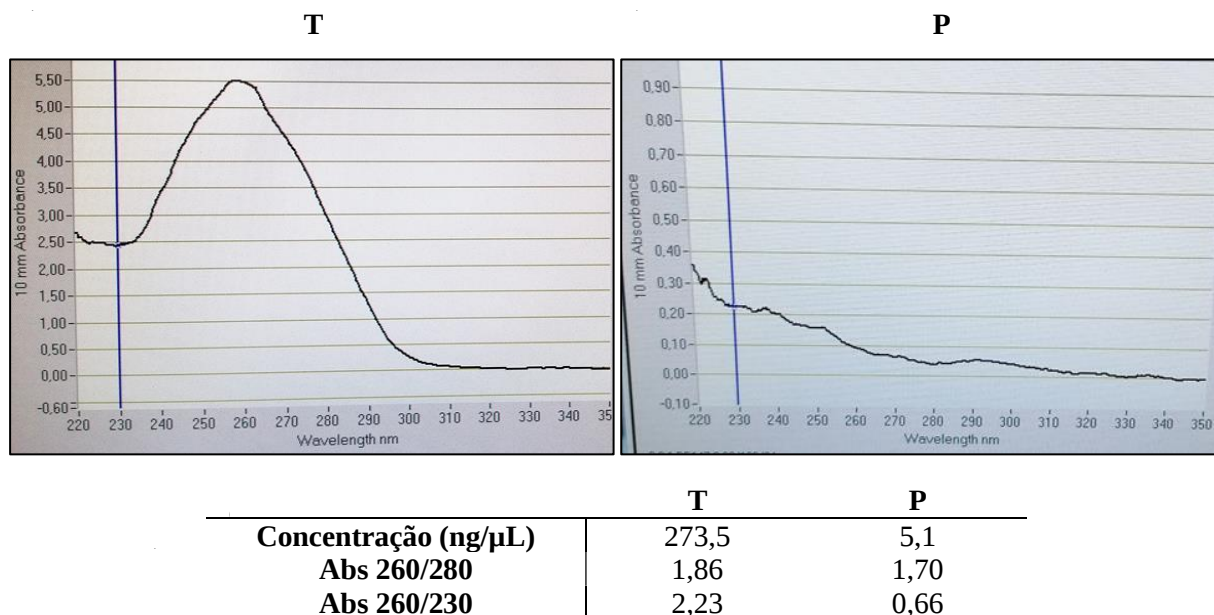


Figura 3.2. Quantificação e análise do DNA extraído de uma amostra tumoral e de plasma.

Espectro de absorvância de uma amostra tumoral (A) e de plasma (B); Espectro obtido por espectrofotometria, entre os comprimentos de onda 220 nm e 350 nm. (C) Concentração e razões Abs 260/280 e Abs 260/230 de ambas as amostras.

T: Amostra Tumoral; P: Amostra de plasma.

3.1.1. Amostras de DNA extraídas de tecido tumoral

Na análise do espectro de absorvância referente à amostra de DNA extraída de tecido tumoral (Figura 3.2.A) é nitidamente observada uma elevada absorvância a 260 nm, que evidencia a presença de ácidos nucleicos na amostra. Relativamente ao grau de pureza do DNA extraído, na generalidade amostras de DNA são consideradas puras quando a razão Abs 260/280 é aproximadamente 1,8 e, por outro lado, a razão Abs 260/230 se encontra entre 2,0 e 2,2. Tal como no exemplo selecionado, de um modo geral os espectros e as razões de absorvância não revelam a presença de uma quantidade significativa de contaminantes na amostra, nomeadamente proteicos, que possam interferir com os procedimentos seguintes.

A grande variação associada à quantidade de DNA extraído das amostras tumorais é explicada pela diferença na quantidade de amostra de tecido tumoral disponível para extração.

Deste modo, o procedimento utilizado com recurso a um kit de extração revelou ser adequado para extração de DNA a partir de amostras tumorais, o que é vantajoso por permitir que esta seja realizada de forma rápida e padronizada, fatores importantes para aplicação na prática clínica.

3.1.2. Amostras de DNA extraídas de plasma

O aparente sucesso do procedimento na extração de DNA a partir de tecido tumoral contrasta com o observado para as amostras de DNA extraído de plasma. O espectro de absorvância referente a essas amostras (Figura 3.2B) em muito difere do expectável e tipicamente observado aquando da análise de uma amostra de DNA, particularmente pela ausência de um claro pico de absorvância a 260 nm, cuja ausência é concordante com a reduzida concentração de DNA na amostra e com as razões de absorvância (Figura 3.2C).

3.2. Amplificação e sequenciação do exão 2 de *KRAS* de amostras tumorais e de plasma para deteção de mutações no codão 12 do gene

Com o objetivo de caracterizar as amostras tumorais e de plasma dos doentes quanto à presença de mutações no codão 12 de *KRAS*, procedeu-se à amplificação do exão 2 do gene e à análise dos produtos obtidos por eletroforese em gel de agarose. Após confirmação do sucesso da amplificação, os produtos da reação foram sequenciados, e os cromatogramas analisados para deteção de mutações no codão 12 de *KRAS*.

Apesar de este procedimento ter sido realizado para todas as amostras tumorais, nesta secção será apresentada apenas a análise referente a três amostras (Figura 3.3; linhas 4, 5 e 6). Para cada uma das amostras analisadas é observada uma banda de cerca de 400 pb, compatível com a amplificação do produto de 402 pb, de elevada intensidade, o que indica que se obteve quantidade de produto suficiente para sequenciação. Após verificação do sucesso da reação, os produtos de amplificação foram sequenciados, tendo sido obtidos dois cromatogramas para cada uma das amostras referentes à utilização do *primer forward* e *reverse*, respetivamente.

As restantes amostras tumorais foram analisadas de igual forma, tendo sido obtido o mesmo resultado para todas. Tornar-se-ia exaustivo apresentar os géis de agarose referentes à análise de todas as amostras, pelo que optei por omitir esses resultados.

A análise da sequência do codão 12 (GGT) de *KRAS* foi realizada com recurso aos cromatogramas obtidos, e os genótipos das amostras foram determinados através da análise dos picos de fluorescência observados na posição correspondente ao primeiro e segundo nucleótido do codão. A Figura 3.4 diz respeito à análise de quatro amostras tumorais, amostras 46T, 18T, 7T e 20T, que representam resultados ilustrativos típicos dos genótipos wt/wt (Figura 3.4A), wt/G12V (Figura 3.4B), wt/G12D (Figura 3.4C) e wt/G12R (Figura 3.4D), respetivamente.

A amostra 46T (Figura 3.4A) apresenta apenas um pico em todas as posições do codão (alelo wt, GGT), já as amostras 18T (Figura 3.4B) e 7T (Figura 3.4C) apresenta dois picos na posição correspondente ao segundo nucleótido do codão, um pico referente ao nucleótido guanina (alelo wt, GGT) e outro à timina (alelo G12V, GTT) ou adenina (alelo G12D, GAT), respetivamente. Por outro lado, a amostra 20T (Figura 3.4D) apresenta dois picos na posição correspondente ao primeiro nucleótido do codão, um pico referente ao nucleótido guanina (alelo wt) e outro à citosina (alelo G12R, CGT).

As restantes amostras tumorais foram analisadas de igual forma, mas tornar-se-ia exaustivo descrever todos os pormenores para cada uma, pelo que optei por incluir uma tabela resumo: Tabela 3.1.

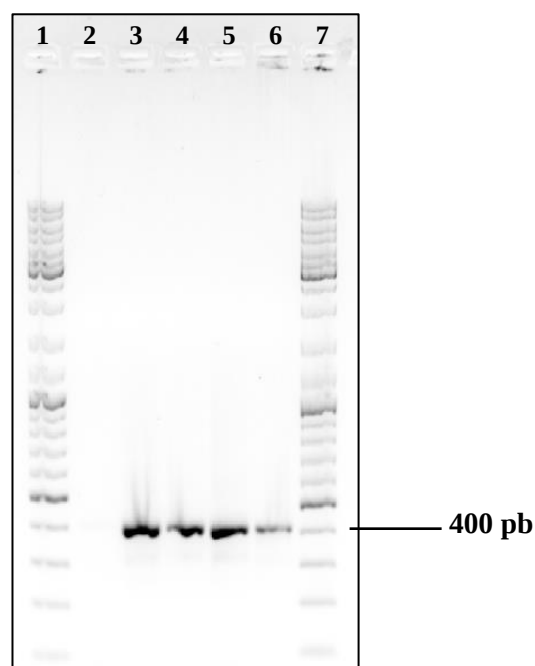


Figura 3.3. Eletroforese em gel de agarose para análise da amplificação do exão 2 de *KRAS*. Gel 1% em TAE 1x com visualização com Gel Red; Marcador Molecular Gene Ruler 100 bp DNA Ladder; 90 V, 1h. 1– Marcador Molecular, 2- Controlo Negativo, 3- Controlo positivo (linhagem SW48), 4- Amostra Tumoral 58T, 5- Amostra Tumoral 59T, 6- Amostra Tumoral 65T, 7 – Marcador Molecular.

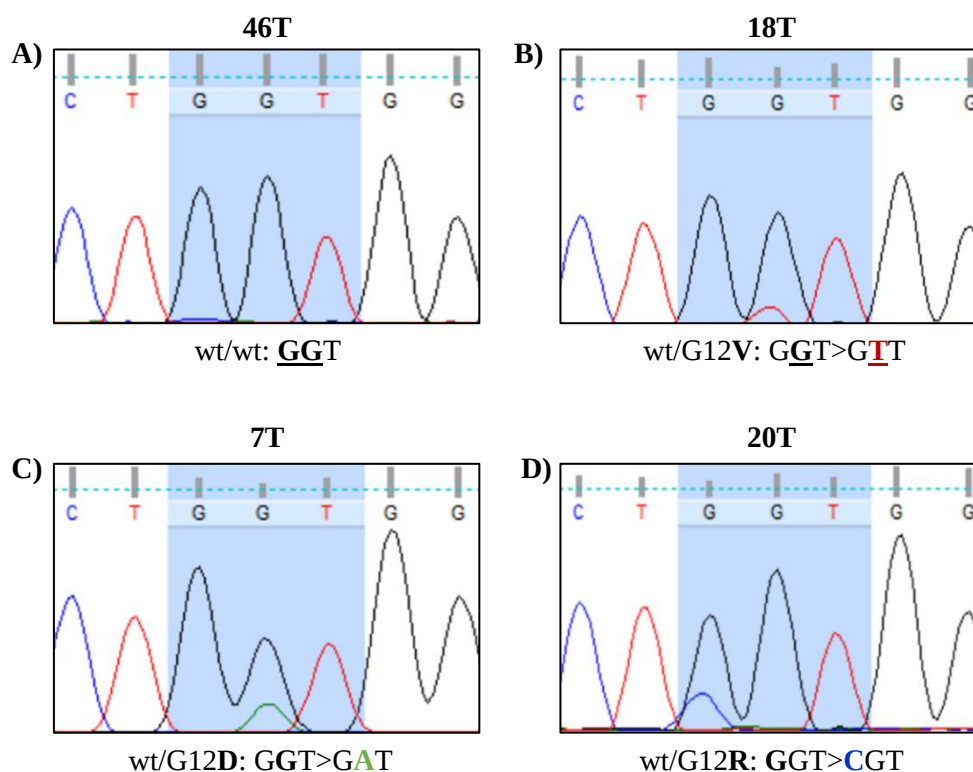


Figura 3.4. Análise da sequência do codão 12 de *KRAS* obtida por Sequenciação de Sanger. Cromatogramas referentes às amostras tumorais 46T (A), 18T (B), 7T (C) e 20T (D) e identificação dos respectivos genótipos.

Tabela 3.1. Tabela resumo dos resultados da sequenciação do codão 12 de *KRAS* das amostras tumorais.

Codão 12 de <i>KRAS</i>	Amostras Tumorais (T)
wt/wt	3T, 9T, 11T, 21T, 36T, 39T, 46T, 47T, 66T, 69T, 74T, 75T, 79T, 81T, 89T
wt/G12V	4T, 6T, 10T, 12T, 16T, 18T, 35T, 78T, 83T, 84T, 98T
wt/G12D	1T, 7T, 8T, 13T, 17T, 23T, 30T, 31T, 37T, 38T, 48T, 58T, 59T, 88T, 93T, 100T
wt/G12R	5T, 20T, 28T, 73T
wt/G12C	65T, 90T

A análise apresentada foi realizada para todas as amostras tumorais, tendo sido bem-sucedida, contudo, a metodologia utilizada não revelou ser adequada para a caracterização das amostras de DNA extraídas de plasma.

Ao contrário do observado para as amostras tumorais, após a realização das reações de amplificação das amostras de plasma e análise do produto obtido por eletroforese, não foi possível observar a banda de 402 pb, ou, por outro lado, foi observada uma banda muito sutil que reflete uma quantidade

de produto limitada e insuficiente para sequenciação. Por esta razão, optou-se por realizar quatro reações de amplificação independentes para cada amostra, juntar e concentrar, e ressuspender o *pellet* obtido no volume mínimo requerido para sequenciação. Posteriormente, as amostras foram novamente analisadas por eletroforese.

Ainda assim, para algumas das amostras analisadas não foi possível observar a banda pretendida, o que inviabilizou a sequenciação do exão 2 de *KRAS* e consequentemente a detecção de mutações no codão 12 do gene (Amostras NA, Tabela 3.2). As restantes amostras, para as quais foi possível observar a banda de 402 pb, ainda que muito sumida no gel, foram enviadas para sequenciação. Novamente, e ao contrário do que ocorreu aquando da análise das amostras tumorais, não foi possível sequenciar todas as amostras (Amostras NS, Tabela 3.2).

A análise dos cromatogramas referentes à sequenciação das amostras de plasma foi realizada de acordo com o procedimento descrito acima para as amostras tumorais, tendo sido detetada a mutação *KRAS* G12V na amostra 16P, em concordância com a respetiva amostra tumoral wt/G12V (16T, Tabela 3.1). As restantes amostras de plasma foram caracterizadas como wt/wt, independentemente de pertencerem a doentes com amostras tumorais mutadas (Amostras wt/wt, Tabela 3.2).

Tabela 3.2. Tabela resumo dos resultados da sequenciação do codão 12 de *KRAS* das amostras de plasma.

Codão 12 de <i>KRAS</i>	Amostras de plasma (P)
wt/wt	1P, 4P, 6P, 7P, 11P, 13P, 17P, 23P, 28P, 34P, 39P, 40P, 43P, 47P, 48P, 59P, 65P, 66P, 69P, 74P, 81P, 83P, 84P, 93P
wt/G12V	16P
NA	58P, 73P
NS	21P, 25P, 46P, 75P, 78P, 79P, 88P, 89P, 90P, 98P, 100P

NA: Não foi possível amplificar o exão 2 de *KRAS*; NS: Não foi possível sequenciar o exão 2 de *KRAS*.

3.3. Reação de ARMS para detecção da mutação *KRAS* G12V

3.3.1. Análise do *primer* G12V-específico utilizado na reação de ARMS para detecção da mutação *KRAS* G12V

Considera-se que, em geral, a extensão de uma nova cadeia de DNA ocorre com menor eficiência para duplexes *mismatch primer*-DNA, o que, de acordo com Huang et al.⁶³ resulta da reduzida eficiência de extensão da Taq Polimerase na presença de um *mismatch* na região 3' do duplex. Esta propriedade da enzima, associada à ausência de atividade de exonuclease 3' - 5', é a base do funcionamento do

ARMS. Deste modo, no desenvolvimento deste método é essencial que o nucleótido 3' de um dos *primers* da reação seja alelo-específico e consequentemente, aquando da hibridação com os restantes alelos do gene em estudo, seja formado um *mismatch* que afete a processividade da enzima.

Tendo em conta que se pretende identificar amostras que apresentam a mutação *KRAS* G12V, caracterizada pela transversão G>T (GGT>GTT) no codão 12 de *KRAS*, o nucleótido 3' do *primer forward* G12V-específico tem obrigatoriamente de ser uma timina. Consequentemente, a hibridação do *primer* em amostras sem a mutação *KRAS* G12V irá resultar num *mismatch* na região 3' do duplex (Tabela 3.3) e na redução da eficiência de amplificação.

Em adição, com o intuito de aumentar a especificidade da reação, o *primer forward* apresenta um *mismatch* adicional no penúltimo nucleótido, *mismatch* T(*primer*):C(DNA) em relação ao alelo wt, o que se traduz numa extensão 10^{-4} a 10^{-5} vezes menos eficiente comparativamente à extensão do emparelhamento entre bases complementares G:C ⁶³. Este *mismatch*, considerado um *mismatch* forte e favorável para aplicação em reações de ARMS, irá ser formado não só pela hibridação do *primer* a um DNA wt, mas também ao alelo G12D, passando ambos a apresentar dois *mismatches* com a região 3' do *primer* (Tabela 3.3). A hibridação do *primer* com o alelo G12R, associado a 15% das mutações em *KRAS* em PDAC ¹¹, resulta no *mismatch* T:G (Tabela 3.3) que, apesar de resultar numa eficiência de extensão 5 a 100 vezes inferior ao *mismatch* T:C descrito acima, se traduz numa extensão 10^{-3} a 10^{-4} vezes menos eficiente do que G:C ⁶³. Por outro lado, a hibridação do *primer* selecionado com o alelo *KRAS* G12C resulta num único *mismatch* com o nucleótido 3' G12V-específico.

Tabela 3.3. Hibridação do *primer* G12V-específico com diferentes alelos de *KRAS*.

Primer G12V-específico	
<i>KRAS</i> wt (GGT)	5' CTTGTGGTAGTTGGAGCT TT 3' III III III III III III III III 3' GAACACCATCAACCTCGACC 5'
<i>KRAS</i> G12V (GGT>GTT)	5' CTTGTGGTAGTTGGAGCT TT 3' III III III III III III III III 3' GAACACCATCAACCTCGACA 5'
<i>KRAS</i> G12D (GGT>GAT)	5' CTTGTGGTAGTTGGAGCT TT 3' III III III III III III III III 3' GAACACCATCAACCTCGACT 5'
<i>KRAS</i> G12R (GGT>CGT)	5' CTTGTGGTAGTTGGAGCT TT 3' III III III III III III III III 3' GAACACCATCAACCTCGAGC 5'
<i>KRAS</i> G12C (GGT>TGT)	5' CTTGTGGTAGTTGGAGCT TT 3' III III III III III III III III 3' GAACACCATCAACCTCGAAC 5'

T: Nucleótido degenerado; **TT**: Nucleótico G12V-específico.

3.3.2. Condições do ARMS para detecção da mutação *KRAS* G12V

Tendo em conta que as duas mutações mais comuns em *KRAS* no contexto de PDAC são as mutações *missense* *KRAS* G12D e G12V, selecionou-se a amplificação alelo-específica, ARMS, como metodologia de detecção, e procedeu-se à otimização da reação para detecção do alelo G12V.

Ainda que o objetivo final seja a aplicação do método em contexto clínico, o processo de otimização foi realizado com recurso às linhagens celulares SW48 e SW480, homozigóticas wt e G12V, respetivamente. Esta opção é justificada pela facilidade de acesso a linhagens celulares comparativamente a amostras biológicas, que se encontram disponíveis em quantidades limitadas, especialmente no que diz respeito a amostras de tecido tumoral cuja obtenção depende de procedimentos invasivos como biópsias.

A reação de ARMS foi realizada com recurso a um *primer forward* G12V-específico, descrito na secção anterior, que favorece a ocorrência de amplificação em amostras contendo a mutação *KRAS* G12V comparativamente aos restantes alelos do gene. Deste modo, foi realizado um processo de otimização no sentido de aumentar a eficiência de amplificação da linhagem SW480 (G12V/G12V) relativamente à linhagem SW48 (wt/wt). Durante todo o processo de otimização, sumarizado na Figura 3.5, a análise de cada condição testada foi realizada por eletroforese em gel de agarose.

Condições ARMS	Figura Gel
Condição Inicial (Tabelas 2.6 e 2.7)	
<i>Annealing</i> 53 °C, 45 s, 30 ciclos	3.6
Extensão 72 °C, 30 s	
↓	
Adição DMSO (2%)	3.6
↓	
Aumento Ta de 53 °C para 55 °C	3.7
↓	
Realização de dois ciclos de temperatura	
<i>Annealing</i> 55 °C, 45 s, 20 ciclos	3.8
<i>Annealing</i> 63 °C, 45 s, 10 ciclos	
↓	
Redução do Tempo de Annealing	
<i>Annealing</i> 55 °C, 45 s	
<i>Annealing</i> 63 °C, 15 s	3.9
E	
<i>Annealing</i> 55 °C, 15 s	
<i>Annealing</i> 63 °C, 45 s	
↓	
Redução do Tempo de Extensão	
Extensão 72 °C, 10 s	3.10
↓	
Combinações de temperaturas de annealing	
<i>Annealing</i> 55 °C/ 60 °C	
<i>Annealing</i> 57 °C/63 °C	3.11
<i>Annealing</i> 52 °C/60 °C	
<i>Annealing</i> 57 °C/60 °C	

Figura 3.5. Esquematização do processo de otimização da reação de ARMS para detecção da mutação KRAS G12V. As condições selecionadas encontram-se destacadas a verde.

Considerando as temperaturas de desnaturação de 48,6 °C e 52,6 °C do *primer forward e reverse*, respetivamente, a primeira temperatura de *annealing* testada foi de 53 °C. Regra geral, a temperatura de *annealing* selecionada tende a ser inferior à temperatura de desnaturação dos *primers* da reação, contudo, tendo em conta a importância da especificidade aquando do desenvolvimento de um ARMS, optou-se por testar uma temperatura mais elevada. O restante programa de reação, bem como a composição da mistura da mesma, segue as condições padrão usualmente associadas a uma reação de PCR, descritas na secção 2.5.

A Figura 3.6 diz respeito à imagem do gel de agarose referente à análise dos produtos da reação. A análise do gel evidencia a presença de uma banda de cerca de 100 pb para ambas as linhagens (linha 2 e 3), compatível com a formação do produto de *KRAS* de 96 pb. Ainda que a intensidade das bandas

seja reveladora de uma amplificação mais eficiente, com formação de mais produto na linhagem SW480, é necessário maximizar a diferença entre as duas através da redução da amplificação na linhagem SW48. Em adição, é evidente a formação de um produto consideravelmente abaixo da banda do marcador correspondente a 100 pb, que, pelo seu tamanho, deverá corresponder a dímeros de *primers*.

Considerando o resultado obtido, e com vista a minimizar a formação das estruturas secundárias associadas aos *primers*, foi adicionado 2% de DMSO à mistura de reação (Figura 3.6, linhas 6 e 7). Ainda que não tenha resultado num efeito tão significativo quanto o esperado, optou-se por continuar a adicionar DMSO à mistura de reação.

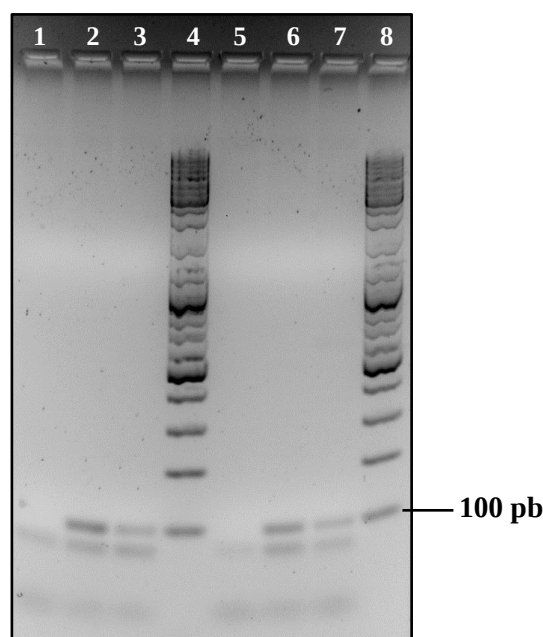


Figura 3.6. Eletroforese em gel de agarose para análise do ARMS G12V-específico: Condição Temperatura de *annealing* 53 °C e Condição 2% DMSO. Gel 1,5% em TAE 1x com visualização com Gel Red; Marcador Molecular Gene Ruler 100 bp DNA Ladder; 90 V, 1h30 (Nota: De modo a facilitar a leitura esta informação será omitida nas legendas seguintes.
1- Controlo Negativo, 2- SW480, 3- SW48, 4- Marcador Molecular, 5- Controlo Negativo com 2% DMSO, 6- SW480 com 2% DMSO, 7- SW48 com 2% DMSO, 8- Marcador Molecular.

Posteriormente, e de modo a não só aumentar a discriminação entre os dois genótipos, mas também eliminar a formação das estruturas secundárias, procedeu-se ao aumento da temperatura de *annealing* em 2 °C, de 53 °C para 55 °C (Figura 3.7). Ainda assim, foram igualmente observadas para ambas as linhagens (linha 3 e 4) as bandas correspondentes à formação dos dímeros de *primers* anteriormente detetados. Em adição, o aumento da temperatura de *annealing* não aparenta ter reduzido significativamente a amplificação na linhagem SW48 (linha 4).

Desta forma, com o intuito de maximizar a diferença de amplificação entre as linhagens, foi testada a realização da reação em duas fases caracterizadas por duas temperaturas de *annealing* diferentes. Tendo em conta que a presença de um *mismatch* na região 3' afeta a processividade da enzima Taq Polimerase, e que, por norma, esta tende a iniciar a extensão a partir *mismatches* apenas após vários

ciclos de amplificação, os 30 ciclos de amplificação realizados foram divididos em 10 ciclos com temperatura de *annealing* 55 °C e 20 com uma temperatura mais elevada, 63 °C, de modo a aumentar a especificidade e dificultar a amplificação na ausência do alelo G12V.

Contrariamente ao expectável pela seleção de uma temperatura de *annealing* 8 °C acima, esta condição resultou na formação de vários produtos inespecíficos de elevado peso molecular (Figura 3.8, linhas 3 e 4), e consequentemente na redução da eficiência de amplificação do produto de *KRAS* de 96 pb.

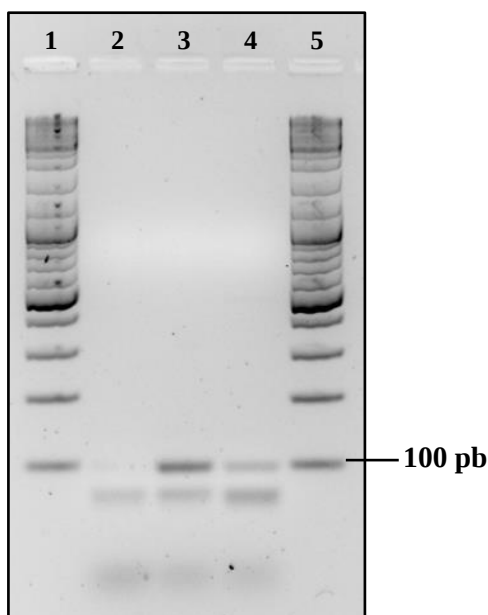


Figura 3.7. Eletroforese em gel de agarose para análise do ARMS G12V-específico: Condição temperatura de *annealing* 55 °C. 1- Marcador Molecular, 2- Controlo Negativo, 3- SW480, 4- SW48, 5- Marcador Molecular.

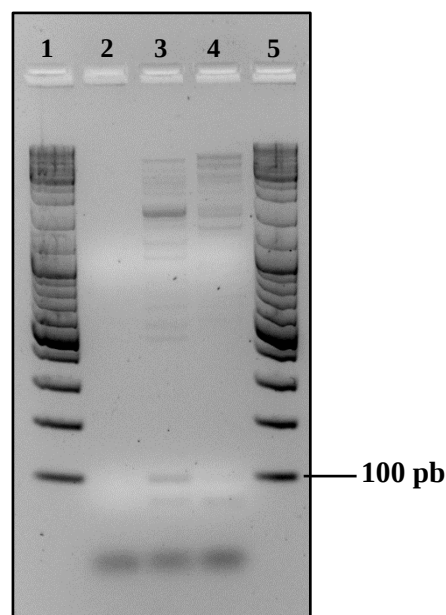


Figura 3.8. Eletroforese em gel de agarose para análise do ARMS G12V-específico: Condição temperatura de *annealing* 55°C/63°C. 1- Marcador Molecular, 2- Controlo Negativo, 3- SW480, 4-SW48, 5- Marcador Molecular.

De modo a melhorar este resultado e favorecer a amplificação do produto de *KRAS* pretendido, poderiam ser testadas três novas condições para aumentar a especificidade da reação: 1) aumentar a temperatura de *annealing*, 2) reduzir o tempo de *annealing*, ou 3) reduzir o tempo de extensão. Considerando a temperatura de desnaturação dos *primers* e o facto da estratégia de otimização seguida até ao momento ter sido baseada no aumento da temperatura de *annealing*, esta hipótese não foi considerada. Por outro lado, tanto a redução do tempo de *annealing*, como do tempo de extensão, seriam opções viáveis, pelo que se testou primeiramente a primeira opção, uma vez que a redução do tempo de *annealing* minimiza a possibilidade da ocorrência de hibridação em locais inespecíficos no DNA.

O tempo de *annealing* anteriormente selecionado para ambas as temperaturas de *annealing*, 55 °C e 63 °C, foi de 45 segundos, pelo que se testou a sua redução para 15 segundos para cada uma das temperaturas individualmente. Os resultados obtidos encontram-se na Figura 3.9.

Na condição referente à redução do tempo de *annealing* a 63 °C (linhas 6 e 7) não são observadas bandas a cerca de 100 pb para nenhuma das linhagens analisadas, o que permite concluir que 15 segundos é insuficiente para que ocorra *annealing* dos *primers* a esta temperatura. Este resultado deverá ser explicado pela elevada temperatura selecionada comparativamente à temperatura de desnaturação dos *primers*, o que por si só, dificulta a sua hibridação.

Contrariamente, na condição referente à redução do tempo de *annealing* a 55 °C para 15 segundos é visualizada uma banda a cerca de 100 pb para ambas as linhagens (linha 3 e 4). No entanto, a banda referente à linhagem SW480 apresenta muito baixa intensidade apesar de serem igualmente visualizadas as bandas referentes à formação dos produtos inespecíficos, o que revela que esta condição não favorece a formação do produto de *KRAS* pretendido. Ainda assim, prosseguiu-se com a condição anterior, e foi avaliado o efeito da redução do tempo de extensão a 72 °C de 30 segundos para 10 segundos em ambas as fases de amplificação. Tendo em conta que o produto da reação é de 96 pb e que a taxa de extensão da Taq Polimerase é de cerca de 1 min/ 1 kb, o tempo testado deverá ser suficiente para amplificar o produto de *KRAS* e dificultar a formação dos produtos mais longos.

Ainda que esta condição tenha contribuído para reduzir substancialmente a amplificação dos produtos inespecíficos, ainda observados na linhagem SW48 (Figura 3.10, linha 4), a banda de 96 pb da linhagem SW480 (Figura 3.10, linha 3) apresenta uma intensidade muito reduzida. Em adição, a observação das bandas referentes à formação de dímeros de *primers* permanece, o que parece indicar que a sua formação é favorecida independentemente da condição testada.

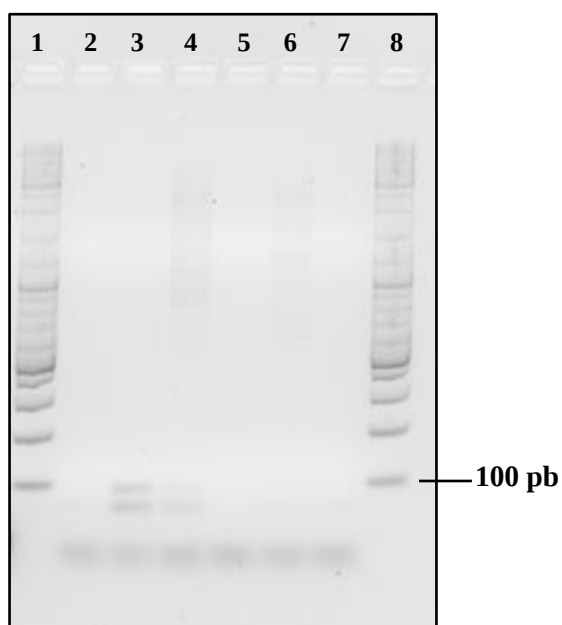


Figura 3.9. Eletroforese em gel de agarose para análise do ARMS G12V-específico: Condição redução do tempo de *annealing*. 1- Marcador Molecular, 2- Controlo Negativo 15 s 55 °C, 3- SW480 15 s 55 °C, 4-SW48 15 s 55 °C, 5- Controlo Negativo 15 s 63 °C, 6- SW480 15 s 63 °C, 7- SW48 15 s 63 °C, 8- Marcador Molecular.

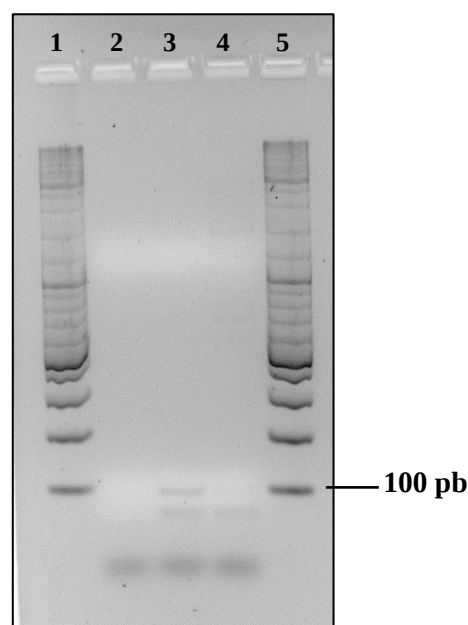


Figura 3.10. Eletroforese em gel de agarose para análise do ARMS G12V-específico: Condição redução do tempo de extensão. 1- Marcador Molecular, 2- Controlo Negativo, 3- SW480, 4-SW48, 5- Marcador Molecular.

A estratégia seguinte teve como objetivo aumentar a eficiência de amplificação do produto de *KRAS*, tendo para tal sido mantidos os 10 segundos de extensão e testadas diferentes combinações de temperaturas de *annealing* (Figura 3.11): 1) 55 °C/ 60 °C (linhas 6 e 7) °C, 2) 57 °C/63 °C (linhas 9 e 10), 3) 52 °C/60 °C (linhas 12 e 13) e 4) 57 °C/60 °C (linhas 15 e 16).

Para todas as condições é observada a banda de cerca de 100 pb para ambas as linhagens, contudo, as bandas referentes à condição 57 °C/63 °C (linhas 9 e 10) apresentam, tal como na condição inicial 55 °C/63 °C (linhas 3 e 4), baixa intensidade independentemente do genótipo da linhagem, o que reflete uma amplificação pouco eficiente. Este resultado era expectável considerando que a condição combina as duas temperaturas de *annealing* mais elevadas.

Por outro lado, apesar de a condição 57 °C/60 °C (linhas 15 e 16) resultar em bandas mais intensas, ou seja, na formação de maior quantidade de produto, não permite diferenciar os dois genótipos em análise, não sendo por isso compatível com o objetivo do ARMS a ser desenvolvido.

Na análise do gel, a intensidade da banda referente à linhagem SW480 da condição 52 °C/60 °C (linhas 12) sobressai comparativamente às restantes e à banda da linhagem SW48 correspondente (linha 13). Por esta razão, uma vez que a condição 52 °C/60 °C revelou ser a que mais favorece a amplificação do produto de *KRAS* em ambas as linhagens, mas particularmente na SW480 que apresenta a mutação *KRAS* G12V a ser detetada, esta foi a condição selecionada. Todavia, esta não permitiu eliminar a ocorrência de amplificação na linhagem SW48, nem a formação de dímeros de *primers*.

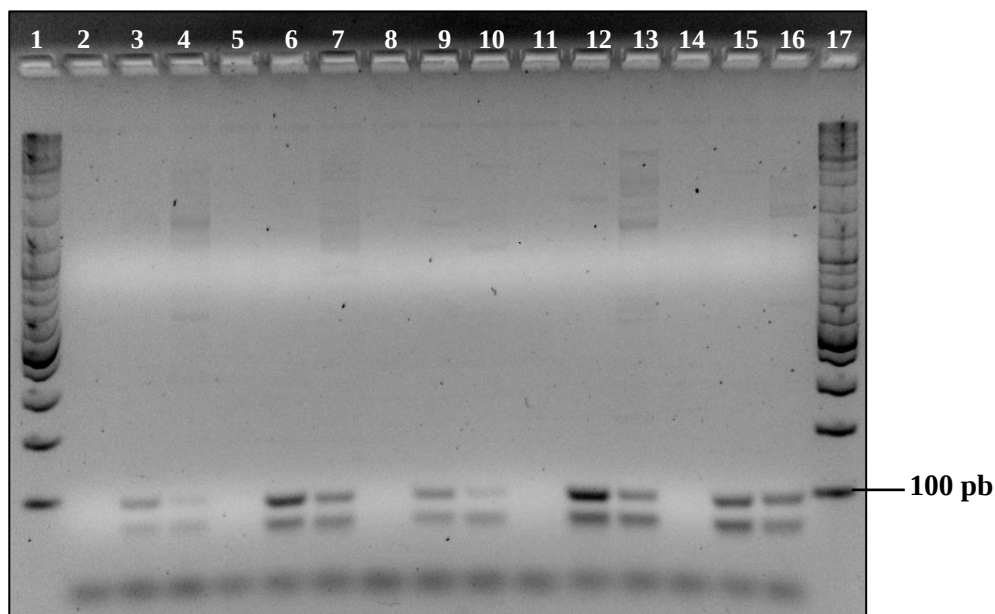


Figura 3.11. Eletroforese em gel de agarose para análise do ARMS G12V-específico: Condição diferentes temperaturas de *annealing*. 1- Marcador Molecular, 2- Controlo Negativo 55 °C/63 °C, 3- SW480 55 °C/63 °C, 4-SW48 55 °C/63 °C, 5- Controlo Negativo 55 °C/60 °C, 6- SW480 55 °C/60 °C, 7- SW48 55 °C/60 °C, 8- Controlo Negativo 57 °C/63 °C, 9- SW480 57 °C/63 °C, 10-SW48 57 °C/63 °C, 11- Controlo Negativo 52 °C/60 °C, 12- SW480 52 °C/60 °C, 13-SW48 52 °C/60 °C, 14- Controlo Negativo 57 °C/60 °C, 15- SW480 57 °C/60 °C, 16-SW48 57 °C/60 °C, 17- Marcador Molecular.

3.3.3. Condições da reação de ARMS em Tempo Real

Durante todo o processo de otimização a análise de cada condição testada foi realizada com base na visualização dos produtos de amplificação por eletroforese em gel de agarose, uma vez que permite de forma mais inequívoca confirmar que o produto da reação é o pretendido, bem como avaliar a presença de produtos inespecíficos e estruturas secundárias associadas aos *primers*. Contudo, o objetivo deste projeto é desenvolver um método que permita uma análise rápida do resultado, razão pela qual se pretende que o ARMS seja realizado em Tempo Real e, deste modo, o resultado seja obtido no final da reação sem a necessidade de realizar um método de análise adicional.

No entanto, não foi possível estabelecer uma condição que permitisse eliminar a ocorrência de amplificação na linhagem wt/wt SW48, nem a formação de dímeros de *primers*. Esta observação aparenta inviabilizar que, aquando da realização do ARMS em Tempo Real, a identificação dos genótipos seja realizada através da análise dos valores de Ct obtidos para cada amostra. Ainda assim, com o intuito de prever o resultado da realização do ARMS em Tempo Real por meio de deteção não específica, foram testadas duas condições: a adição de EvaGreen à mistura de reação e a utilização da NZYTaQ II 2x Green Master Mix da NzyTech, doravante designada Green Master Mix.

Analizando os resultados referentes à adição de EvaGreen (Figura 3.12, linha 5 e 6) é possível concluir que, ainda que a sua adição à mistura de reação minimize a formação de dímeros de *primers*, esta reduz a diferença de amplificação entre as linhagens. Por outro lado, a utilização da Green Master Mix (linha 8 e 9) aparenta favorecer a formação de dímeros de *primers*, mas maximiza a diferença de amplificação entre as linhagens.

Tendo em conta os resultados descritos, nenhuma das condições permitiu simultaneamente reduzir a formação de dímeros de *primers* e diferenciar eficientemente as duas linhagens. Assim, a partir deste resultado, seria possível optar por prosseguir com a utilização de EvaGreen e otimizar a diferença de amplificação entre a linhagem wt/wt e G12V/G12V, ou utilizar a Green Master Mix e otimizar a reação de modo a minimizar a formação de dímeros de *primers*.

Considerando que se pretende desenvolver um método que possibilite a deteção da mutação *KRAS* G12V em amostras clínicas de doentes com PDAC, é essencial que a reação de amplificação seja alelo-específica, pelo que se optou por prosseguir com a utilização da Green Master Mix. Outros dos aspetos a considerar na utilização de uma Master Mix diz respeito à redução do número de reagentes utilizados na mistura de reação, e consequentemente à redução dos passos de pipetagem necessários para a preparação da mesma. Desta forma, o tempo de trabalho laboratorial é reduzido, bem como a probabilidade da ocorrência de erros no procedimento.

A formação de dímeros de *primers* no ARMS apresenta uma grande limitação para a sua realização em Tempo Real, uma vez que, devido à utilização de um método de deteção não específico, estes deverão resultar na aquisição de fluorescência, dificultando a caracterização das amostras pela análise

da fluorescência ao longo da amplificação (valores de Ct). Desta forma, e tal como referido anteriormente, seria necessário otimizar a reação de modo a minimizar a formação dos dímeros observados. Porém, o processo de otimização anterior teve como um dos objetivos principais eliminar a formação dos dímeros de *primers*, não tendo, no entanto, sido encontrada uma condição que possibilitasse a sua eliminação. Outros dos aspetos a considerar diz respeito à especificidade do ARMS desenvolvido, uma vez que, em todas as condições testadas, ocorreu amplificação na linhagem wt/wt SW48, apesar da utilização de um *primer* duplamente degenerado.

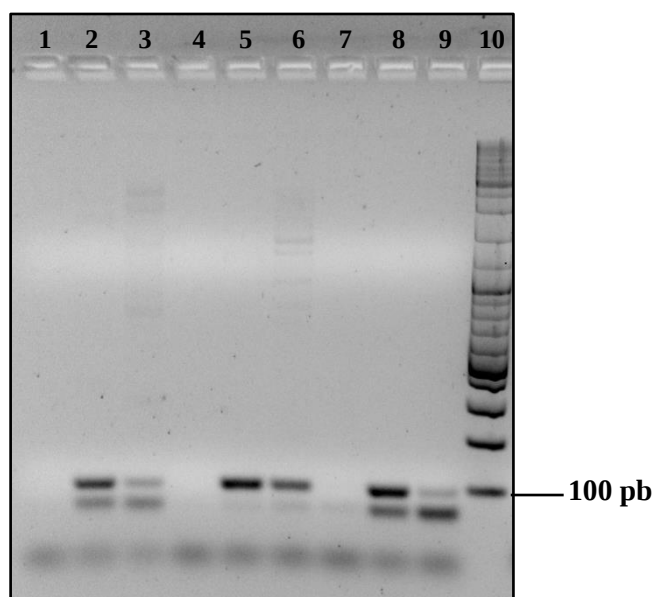


Figura 3.12. Eletroforese em gel de agarose para análise do efeito da adição de EvaGreen e NZYTaQ II 2x Green Master Mix à mistura de reação de ARMS. 1- Controlo Negativo, 2- SW480, 3- SW48, 4- Controlo Negativo EvaGreen, 5- SW480 EvaGreen, 6- SW48 EvaGreen, 7- Controlo Negativo NZYTaQ II 2x Green Master Mix, 8- SW480 NZYTaQ II 2x Green Master Mix, 9- SW48 NZYTaQ II 2x Green Master Mix, 10- Marcador Molecular.

3.3.4. ARMS/HRMA para deteção da mutação *KRAS* G12V em amostras tumorais de doentes com PDAC

Apesar de as reações de ARMS serem desenvolvidas com o intuito de serem alelo-específicas e resultarem em amplificação apenas na presença do alelo para o qual foram desenvolvidas, a DNA polimerase, ainda que com menor eficiência, consegue amplificar a partir de *mismatches*. Em concordância, e tal como demonstrado anteriormente, a reação de ARMS otimizada não é inteiramente específica para o alelo G12V, tendo sempre havido alguma amplificação na linhagem wt/wt.

A ocorrência de amplificação em amostras sem a mutação *KRAS* G12V irá resultar num *mismatch* com o nucleótido 3' G12V-específico do *primer forward*. Deste modo, é expectável que a análise do perfil de desnaturação permita diferenciar amostras contendo a mutação *KRAS* G12V das restantes.

Adicionalmente, a análise do perfil de desnaturação deverá permitir diferenciar entre a formação do produto de *KRAS* pretendido e os dímeros de *primers* formados na reação, que, por apresentarem um tamanho inferior, são desnaturados a temperaturas mais baixas.

Assim, por permitir aumentar o grau de confiança nos resultados obtidos, a realização de HRMA aparenta ser vantajosa neste contexto. A aplicação de HRMA é exequível neste caso pela utilização de um sistema de detecção não específico que, com o aumento de temperatura, se irá dissociar do produto de ARMS (dsDNA) ao longo da sua desnaturação, resultando na diminuição da fluorescência, e na consequente obtenção do perfil de desnaturação da amostra.

Pelas razões apresentadas, e no sentido de desenvolver uma metodologia com maior especificidade para a detecção da mutação em estudo, e assim minimizar os resultados falsos positivos, optou-se por acoplar o ARMS à técnica de HRMA, e caracterizar as amostras em G12V positivas e G12V negativas em função do respetivo perfil de desnaturação.

As reações de ARMS/HRMA foram realizadas e analisadas de acordo com o descrito na secção 2.7, tendo sido obtida para cada amostra a derivada negativa da fluorescência (F) em relação à temperatura (T) ($-dF/dT$) em função da temperatura, doravante designada curva de desnaturação.

Inicialmente foram analisadas seis amostras, duas das quais as linhagens SW48 (wt/wt) e SW480 (G12V/G12V). Tendo em conta que o método desenvolvido visa identificar amostras contendo a mutação G12V no contexto clínico, foram igualmente analisadas quatro amostras tumorais de doentes com PDAC. As amostras tumorais, tal como todas as utilizadas neste projeto, haviam sido previamente sequenciadas para detecção de mutações no codão 12 de *KRAS*, tendo sido selecionadas duas amostras wt/G12V (12T e 18T), uma amostra wt/wt (46T) e uma amostra wt/G12D (13T).

A análise das curvas de desnaturação das seis amostras (Figura 3.13A) revelou a existência de um pico de desnaturação entre os 79 °C e 80,5 °C, o que demonstra a ocorrência de amplificação em todas as amostras. Contudo, os picos de desnaturação apresentam variações no sinal de fluorescência (altura do pico), o que aparenta refletir a eficiência de amplificação e consequentemente a presença ou ausência do alelo *KRAS* G12V nas amostras.

Focando a análise nas linhagens SW480 e SW48, a altura dos picos é claramente discernível, sendo o pico mais alto correspondente à linhagem G12V/G12V, para a qual o ARMS foi otimizado. Os resultados obtidos para as amostras tumorais são concordantes, uma vez que a altura (fluorescência) dos picos de desnaturação das amostras wt/G12V 12T e 18T é superior comparativamente às amostras wt/G12D 13T e wt/wt 46T, nas quais a mutação *KRAS* G12V não foi detetada por SS.

Apesar de promissor por demonstrar uma clara diferenciação entre os resultados obtidos para as amostras *KRAS* G12V e as restantes, o padrão observado não é suficiente para definir um protocolo de análise. Os resultados descritos revelam que, comparando as curvas de desnaturação de todas as amostras, a altura do pico de desnaturação varia em detrimento da presença do alelo G12V na amostra, sendo mais elevado nas amostras nas quais este se encontra presente. Contudo, aquando da análise de amostras

clínicas de genótipo desconhecido, o que se considera um pico de desnaturação elevado, indicativo da presença do alelo G12V na amostra, e um pico com baixo sinal de fluorescência indicativo de amplificação a partir de um *mismatch* na região 3'. Neste sentido, é fundamental estabelecer um critério para a identificação de amostras wt/G12V e G12V/G12V, sendo para tal necessário definir uma curva de desnaturação de referência à qual será comparada a curva de desnaturação das amostras que se pretende caracterizar.

Analisando novamente as curvas de desnaturação obtidas, é visível que os picos de desnaturação referentes às amostras 13T e 46T, nas quais a mutação *KRAS* G12V não foi detetada por SS, são inferiores ao da linhagem SW48, e, por outro lado, os picos das amostras wt/G12V 12T e 18T são superiores (Figura 3.13A). Assim, definindo a linhagem SW48 como referência, e consequentemente o seu pico de desnaturação como *threshold*, aparenta ser possível diferenciar amostras contendo o alelo G12V das restantes.

Com o intuito de acentuar esta diferença e mais facilmente diferenciar as curvas de desnaturação dos diferentes genótipos, foi subtraída a curva de desnaturação da linhagem SW48, definida como referência, às curvas de desnaturação das restantes amostras, sendo assim obtidas as curvas de diferença (Figura 3.13B). Esta abordagem divide de forma inequívoca as amostras analisadas em dois grupos: G12V positivas, que continuam a apresentar um pico de desnaturação com sinal de fluorescência positivo, e G12V negativas, que apresentam uma curva de desnaturação abaixo da linha de referência.

Desta forma, através da aplicação desta metodologia de análise, as amostras 12T e 18T são inequivocamente caracterizadas como G12V positivas, enquanto nas amostras 13T e 46T este alelo não é detetado.

Os resultados descritos são concordantes com os previamente obtidos por sequenciação do exão 2 de *KRAS*, e, apesar do número limitado de amostras analisadas, aparentam revelar a sensibilidade e especificidade do ARMS/HRMA para a deteção da mutação *KRAS* G12V.

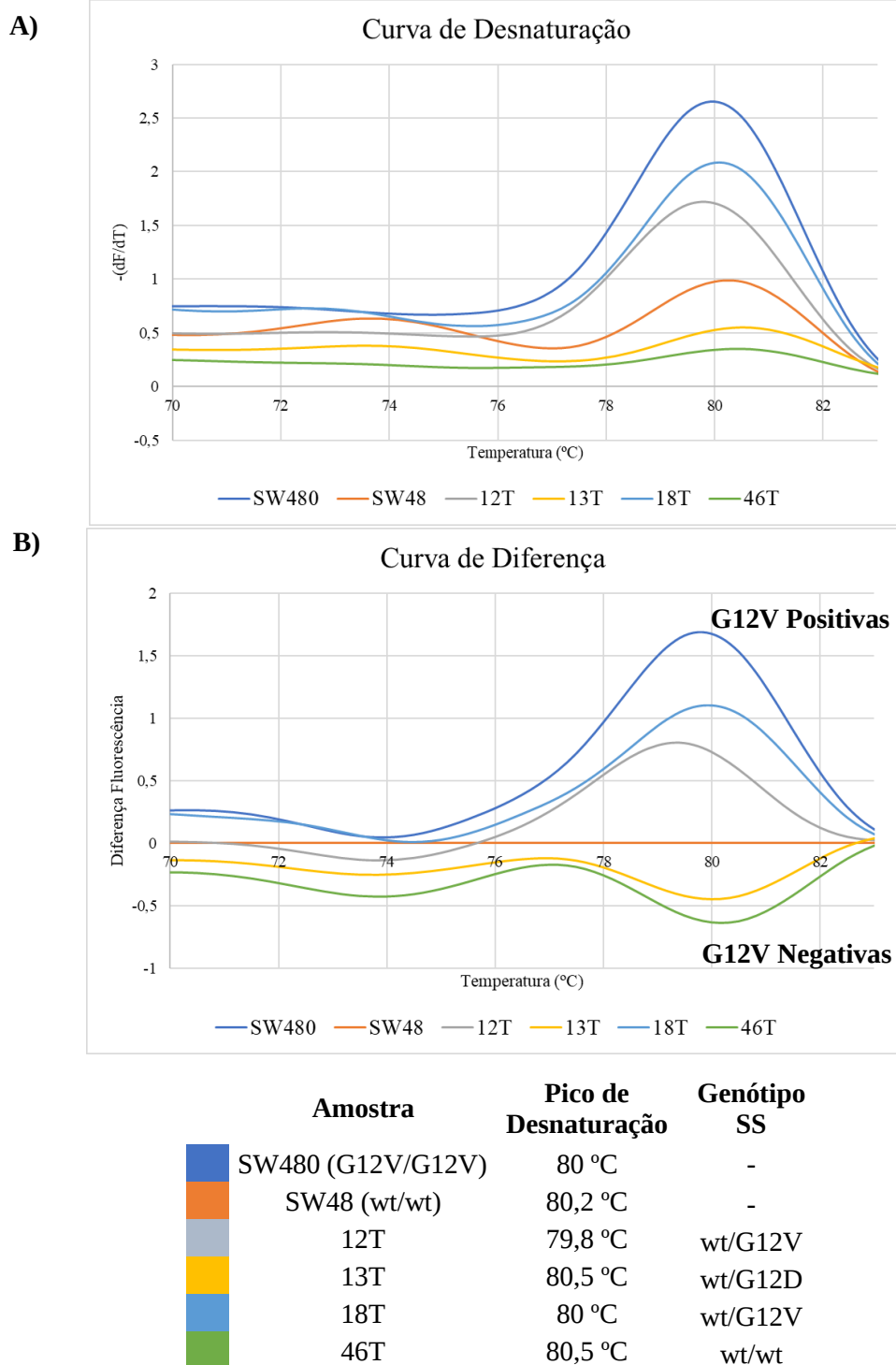


Figura 3.13. HRMA dos resultados de ARMS para detecção da mutação *KRAS* G12V nas linhagens SW480, SW48 e nas amostras tumorais 12T, 13T, 18T e 46T de doentes com PDAC. Curvas de desnaturação (A) e Curvas de diferença (B), e respectivos picos de desnaturação e genótipos determinados por Sequenciação de Sanger (SS).

Posteriormente, com o intuito de avaliar a robustez do método, foram analisadas cinco amostras tumorais adicionais, bem como as amostras 13T, 18T e 46T previamente testadas. Tal como na reação

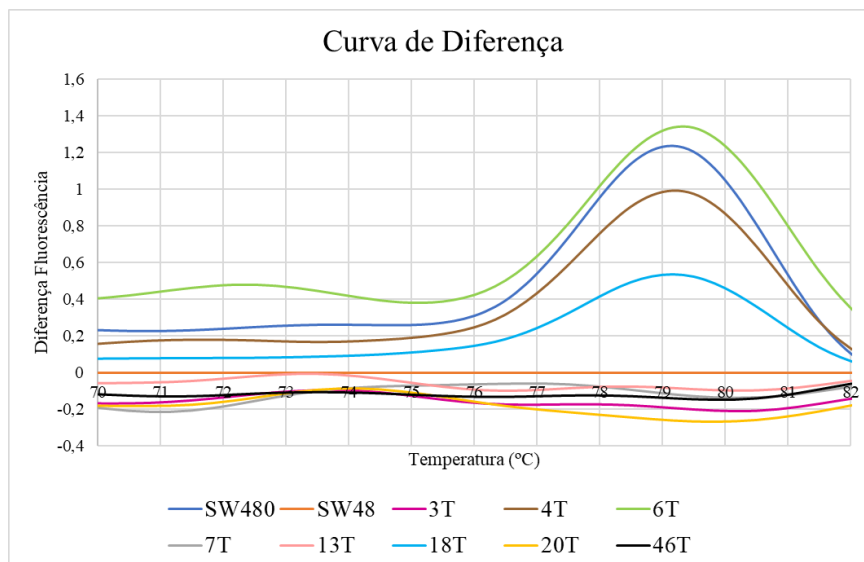
de ARMS/HRMA realizada anteriormente, as linhagens SW48 e SW480 foram utilizadas como controlo wt/referência e controlo G12V, respetivamente. Após a realização do ARMS/HRMA foram obtidas as curvas de diferença de todas as amostras (Figura 3.14).

Atentando na curva de diferença dos controlos G12V SW480 e 18T é evidente a existência de um pico de desnaturação entre os 79 °C e 80,5 °C (79,2 °C e 79,3 °C, respetivamente) que corresponde à deteção do alelo G12V e as caracteriza como G12V positiva. Por outro lado, os picos de desnaturação correspondentes às amostras tumorais controlo G12V negativas 13T e 46T encontram-se abaixo da linha de referência, o que demonstra que o alelo G12V não foi detetado nas amostras. Assim, os resultados obtidos para os controlos da reação são os expectáveis, pelo que permitem validar os resultados relativos às novas amostras tumorais que se pretende analisar.

Adicionalmente, também as amostras 4T e 6T exibem um pico de desnaturação com sinal de fluorescência positivo na mesma região, pelo que, em concordância com o genótipo determinado por SS, e de acordo com o critério anteriormente definido, são G12V positivas. Em oposição, as amostras wt/wt 3T, wt/G12D 7T e wt/G12R 20T apresentam uma curva de desnaturação abaixo da linha de referência, sendo por isso consideradas G12V negativas.

Um dos aspetos a salientar diz respeito ao resultado obtido para as amostras wt/G12D e wt/G12R, que apresentam um perfil de desnaturação coincidente com o das amostras wt/wt e com o padrão de amostras G12V negativas. Apesar de apresentarem igualmente dois *mismatches* com os últimos dois nucleótidos do *primer forward*, um deles é alelo específico (Tabela 3.1), o que se poderia refletir num perfil de desnaturação diferenciador. Contudo, o método de ARMS/HRMA desenvolvido não aparenta permitir diferenciar estes alelos entre si. Neste caso, esta observação não constitui uma limitação, na medida em que revela a especificidade do método para a deteção da mutação *KRAS* G12V e demonstra que amostras clínicas contendo as mutações G12D e G12R não geram resultados equívocos que comprometam a aplicação do ARMS/HRMA. Este aspeto é de extrema importância considerando que estas representam as três mutações mais comuns em PDAC, pelo que no desenvolvimento de métodos de deteção específicos para cada uma é fundamental que estas sejam facilmente diferenciadas.

Adicionalmente à especificidade do método demonstrada pela análise de amostras wt/wt, wt/G12R e wt/G12D, é importante salientar a sua reprodutibilidade, evidenciada pela análise das linhagens SW48 e SW480, e das amostras tumorais 13T, 18T e 46T, para as quais foi obtido o mesmo resultado nas duas reações de ARMS/HRMA apresentadas.



Amostra	Pico de desnaturação	Genótipo SS
SW480 (G12V/G12V)	79,2 °C	-
SW48 (wt/wt)	80 °C	-
3T	79,5 °C	wt/wt
4T	79,3 °C	wt/G12V
6T	79,5 °C	wt/G12V
7T	79 °C	wt/G12D
13T	79,5 °C	wt/G12D
18T	79,3°C	wt/G12V
20T	80 °C	wt/G12R
46T	79,8 °C	wt/wt

Figura 3.14. HRMA dos resultados de ARMS para deteção da mutação *KRAS* G12V nas amostras tumorais 3T, 4T, 6T, 7T, 13T, 18T, 20T e 46T de doentes com PDAC. Curvas de desnaturação das amostras, genótipo determinado por Sequenciação de Sanger (SS), e respetivos picos de desnaturação obtidos por HRMA.

A reação de ARMS/HRMA otimizada para deteção da mutação *KRAS* G12V foi testada num total de quarenta e cinco amostras tumorais de doentes com PDAC previamente caracterizadas por SS quanto à presença de mutações no codão 12 de *KRAS*. Em todas as reações foram utilizadas as linhagens SW480 e SW48 como controlos positivo e negativo, respetivamente, sendo a segunda selecionada como curva de desnaturação de referência. Todas as amostras foram analisadas de igual forma, mas tornar-se-ia exaustivo descrever todos os pormenores para cada uma, pelo que optei por incluir uma tabela resumo: Tabela 3.4.

Das quarenta e cinco amostras analisadas, apenas a amostra 47T gerou um resultado não concordante com o genótipo wt/wt determinado por SS, uma vez que o resultado obtido por ARMS/HRMA a

caracterizou como G12V positiva. Considera-se que, em geral, e tal como descrito na secção 1.3, as técnicas de ARMS e de HRMA apresentam um limite de deteção superior à SS. Desta forma, é plausível que o ARMS/HRMA desenvolvido resulte numa maior taxa de deteção da mutação *KRAS* G12V, por permitir a sua deteção em amostras nas quais a percentagem de DNA mutado se encontra abaixo do limite de deteção da SS. Contudo, tendo em conta que o ARMS/HRMA desenvolvido se trata de uma nova metodologia testada num número limitado de amostras tumorais, não é possível garantir que o resultado obtido para a amostra 47T não se possa tratar de um falso positivo, ainda que o mesmo tenha sido obtido em três análises independentes.

Tabela 3.4. Tabela resumo dos resultados obtidos por ARMS/HRMA para detecção da mutação *KRAS* G12V e *KRAS* G12D em amostras tumorais.

Amostra	SS	ARMS/HRMA <i>KRAS</i> G12D	ARMS/HRMA <i>KRAS</i> G12V
1T	wt/G12D	ND	G12D
3T	wt/wt	ND	ND
4T	wt/G12V	G12V	-
5T	wt/G12R	ND	ND
6T	wt/G12V	G12V	ND
7T	wt/G12D	ND	G12D
8T	wt/G12D	ND	G12D
9T	wt/wt	ND	-
10T	wt/G12V	G12V	ND
11T	wt/wt	ND	ND
12T	wt/G12V	G12V	ND
13T	wt/G12D	ND	G12D
17T	wt/G12D	ND	G12D
18T	wt/G12V	G12V	ND
20T	wt/G12R	ND	ND
21T	wt/wt	ND	ND
23T	wt/G12D	ND	G12D
28T	wt/G12R	ND	ND
30T	wt/G12D	ND	G12D
31T	wt/G12D	ND	G12D
35T	wt/G12V	G12V	ND
36T	wt/wt	ND	ND
38T	wt/G12D	ND	G12D
39T	wt/wt	ND	ND
46T	wt/wt	ND	ND
47T	wt/wt	G12V	ND
48T	wt/G12D	-	G12D
58T	wt/G12D	ND	G12D
59T	wt/G12D	ND	G12D
65T	wt/G12C	ND	ND
66T	wt/wt	ND	ND
69T	wt/wt	ND	ND
73T	wt/G12R	ND	ND
74T	wt/wt	ND	G12D
75T	wt/wt	ND	ND
78T	wt/G12V	G12V	ND
79T	wt/wt	ND	ND
81T	wt/wt	ND	ND
83T	wt/G12V	G12V	ND
84T	wt/G12V	G12V	ND
88T	wt/G12D	ND	G12D
89T	wt/wt	ND	G12D
90T	wt/G12C	ND	G12D
93T	wt/G12D	ND	G12D
98T	wt/G12V	G12V	ND
100T	wt/G12D	ND	G12D

SS: Genótipo por Sequenciação de Sanger; ND: Alelo G12V/G12D não detetado; G12V/G12D: Amostra G12V/G12D positiva; - Sem dados.

3.3.4.1. Protocolo de análise dos resultados de ARMS/HRMA para detecção da mutação *KRAS* G12V

Considerando a análise dos resultados de ARMS/HRMA descritos acima, e utilizando como referência os resultados obtidos por SS, foi estabelecido um protocolo para a identificação de amostras tumorais contendo a mutação *KRAS* G12V, designadas G12V positivas, pela metodologia de ARMS/HRMA desenvolvida:

- Realização do ARMS/HRMA de acordo com o descrito na secção 2.7;
- Obtenção da curva de desnaturação de cada amostra: derivada negativa da fluorescência (F) em relação à temperatura (T) ($-dF/dT$) em função da temperatura;
- Obtenção da curva de diferença de cada amostra: subtração da curva de desnaturação da linhagem SW48 (linhagem de referência) às curvas de desnaturação das restantes amostras;
- Validação da reação através da análise dos controlos selecionados (G12V positivos e G12V negativos) e segundo os critérios definidos:
 - **Amostra G12V positiva:** Apresentam um pico de desnaturação com sinal de fluorescência positivo entre os 79 °C e 80,5 °C;
 - **Amostra G12V negativa:** Não apresentam um pico de desnaturação com sinal de fluorescência positivo entre os 79 °C e 80,5 °C;
- Análise das curvas de diferença das amostras tumorais em análise segundo os critérios definidos acima.

3.3.5. ARMS/HRMA para detecção da mutação *KRAS* G12V em amostras de plasma de doentes com PDAC

Considerando o potencial das biópsias líquidas no diagnóstico, determinação do prognóstico e monitorização do PDAC, foi avaliada a eficiência do ARMS/HRMA na análise de ctDNA para detecção da mutação *KRAS* G12V.

Ao contrário das amostras tumorais, apenas foi possível detetar uma mutação no codão 12 de *KRAS* numa das amostras de plasma sequenciadas, tendo esta sido a mutação *KRAS* G12V na amostra 16P. As restantes amostras de DNA extraído de plasma foram caracterizadas como *KRAS* wt/wt para o codão 12 de *KRAS* (Tabela 3.2), independentemente de pertencerem a doentes com tumores para os quais foram detetadas mutações por SS.

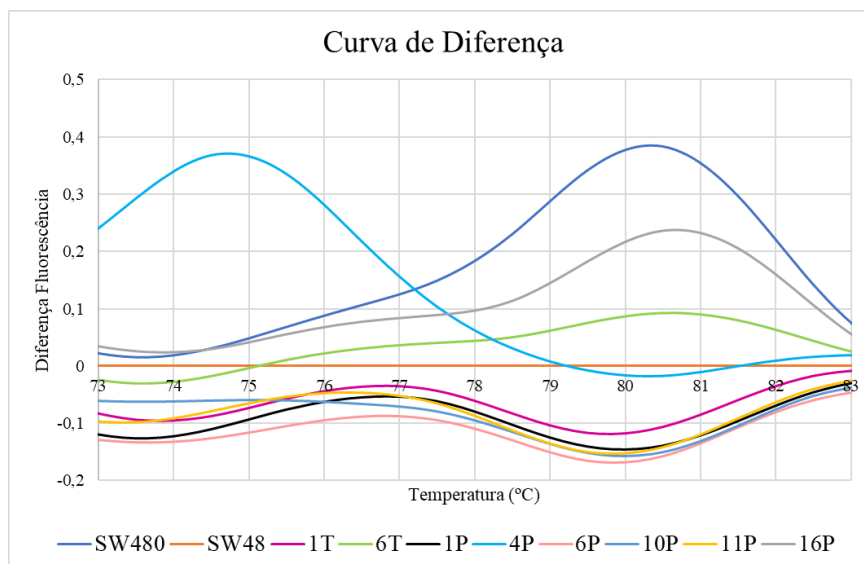
No que diz respeito à mutação *KRAS* G12V, as amostras tumorais correspondentes a quatro doentes: 4, 6, 10 e 16 foram analisadas por SS e caracterizadas em wt/G12V (Tabela 3.1). Posteriormente,

as mesmas amostras foram consideradas G12V positivas por ARMS/HRMA (Tabela 3.4), com exceção da 16T, cuja análise não foi realizada. No entanto, a mutação G12V apenas foi detetada por SS na amostra de plasma do doente 16 (16P), tendo nas restantes sido detetado apenas o alelo wt.

Tendo em conta que o ctDNA libertado no sangue é proveniente de células tumorais, este deverá apresentar a mesma composição genética da massa tumoral que lhe deu origem, e suas metástases ⁶. Desta forma, é expectável que amostras de plasma referentes a doentes para os quais foi detetada uma mutação em *KRAS* nas amostras tumorais, contenham igualmente ctDNA mutado. Contudo, tendo em conta a reduzida quantidade de ctDNA representado no cfDNA total, o limite de deteção modesto associado à SS não a torna a técnica mais adequada no contexto das biópsias líquidas ^{40,51}. Assim, considerando a maior sensibilidade associada ao ARMS em Tempo Real e HRMA, foi testada a eficiência da estratégia ARMS/HRMA desenvolvida na deteção da mutação *KRAS* G12V em DNA extraído de plasma.

A reação de ARMS/HRMA foi realizada nas condições previamente otimizadas para a análise de amostras tumorais, e com recurso à linhagem homozigótica wt SW48 (controlo G12V negativo) e homozigótica G12V SW480 (controlo G12V positivo), assim como às amostras tumorais 1T (wt/G12D) e 6T (wt/G12V) como controlos adicionais da reação. Foram seleccionadas seis amostras de plasma, entre as quais as amostras 4P, 6P, 10P e 16P anteriormente referidas, e, de modo a avaliar a especificidade do método, as amostras 1P e 11P, de doentes com amostras tumorais wt/G12D e wt/wt, respetivamente, por SS e ARMS/HRMA (Figura 3.15).

Após a realização do ARMS/HRMA foi seguida a mesma metodologia de análise aplicada anteriormente às amostras tumorais, pelo que foram obtidas as curvas de diferença de todas as amostras, representadas graficamente na Figura 3.15, pela subtração da curva de desnaturação da linhagem SW48. Seguindo o critério previamente definido, ao contrário de amostras G12V negativas, amostras G12V positivas apresentam um pico de desnaturação com sinal de fluorescência positivo entre os 79 °C e 80,5 °C.



	Amostra	Pico de Desnaturação	Genótipo Plasma SS	Genótipo Tumor SS
	SW480 (G12V/G12V)	80,2 °C	-	-
	SW48 (wt/wt)	80 °C	-	-
	1T	80,8 °C		wt/G12D
	6T	80,2 °C		wt/G12V
	1P	-	wt/wt	wt/G12D
	4P	-	wt/wt	wt/G12V
	6P	-	wt/wt	wt/G12V
	10P	-	wt/wt	wt/G12V
	11P	-	wt/wt	wt/wt
	16P	80,5 °C	wt/G12V	wt/G12V

Figura 3.15. HRMA dos resultados de ARMS para detecção da mutação *KRAS* G12V nas amostras de plasma 1P, 4P, 6P, 10P, 11P e 16P de doentes com PDAC. Curvas de diferença das amostras e respetivos picos de desnaturação. Genótipo das amostras determinado por Sequenciação de Sanger (SS), e, no caso das amostras de plasma, genótipo das amostras tumorais correspondentes.

Atentando nas curvas de diferença da linhagem SW480 e da amostra tumoral 6T (wt/G12V) é evidente a existência de um pico de desnaturação por volta dos 80 °C (80,2 °C) que corresponde à detecção do alelo G12V e as caracteriza como G12V positivas. Por outro lado, a amostra tumoral 1T (wt/G12D), que não tem o alelo em análise, apresenta uma curva de desnaturação abaixo da linha de referência, sendo por isso considerada G12V negativa. Assim, os resultados obtidos para os quatros controlos da reação são os expectáveis, pelo que permitem validar os restantes resultados relativos às amostras de plasma.

Tendo em conta o genótipo determinado para as amostras tumorais correspondentes, seria expectável que o perfil de desnaturação das amostras de plasma 4P, 6P, 10P e 16P correspondesse ao das

amostras SW480 e 6T, enquanto o perfil das amostras 1P e 11P correspondesse ao das amostras SW48 e 1T. Contudo, nem tudo foi verificado.

A análise das amostras 1P e 11P resultou numa curva de diferença coincidente com a da amostra 1T G12V negativa, caracterizada pela ausência de um pico de desnaturação com sinal de fluorescência positivo. Este resultado é concordante com o genótipo das respetivas amostras tumorais e com a análise por SS (Tabela 3.5).

Relativamente às amostras 4P, 6P, 10P e 16P, e considerando o genótipo wt/G12V das amostras tumorais correspondentes, a sua análise por ARMS/HRMA deveria resultar num perfil de desnaturação diferenciador que possibilitasse a sua identificação como G12V positivas. No entanto, apenas a curva de diferença referente à amostra 16P apresenta um pico de desnaturação no intervalo de temperatura esperado (a 80,5 °C), concordante com a análise por SS, e com o observado para o controlo positivo SW480 e para a amostra tumoral 6T (wt/G12V). Em oposição, o perfil de desnaturação das amostras 4P, 6P e 10P não evidencia a existência do pico de desnaturação G12V-específico, sendo coincidente com o da linhagem SW48 e com as restantes amostras G12V negativas.

Assim, apesar de a mutação *KRAS* G12V ter sido detetada nas amostras tumorais 4T, 6T e 10T tanto por SS, como por ARMS/HRMA, não o foi nas amostras de plasma 4P, 6P e 10P correspondentes, por nenhum dos métodos (Tabela 3.5). Deste forma conclui-se que, apesar de os resultados obtidos anteriormente demonstrarem a sensibilidade do ARMS/HRMA para a deteção da mutação *KRAS* G12V em amostras tumorais, o mesmo não é verificado para a análise de DNA extraído de plasma. Este resultado é concordante com a dificuldade, nalguns casos impossibilidade, de amplificar e sequenciar o exão 2 de *KRAS* (secção 3.2).

A reação de ARMS/HRMA otimizada para deteção da mutação *KRAS* G12V foi testada num total de dezasseis amostras de plasma de doentes com PDAC previamente caracterizadas por SS quanto à presença de mutações no codão 12 de *KRAS*, e os resultados encontram-se sumarizados na Tabela 3.5.

O insucesso do ARMS/HRMA na análise de DNA extraído de plasma poderá ser explicado pela quantidade de ctDNA mutado presente no plasma, bem como pela quantidade insuficiente de ctDNA extraído das amostras.

A reduzida quantidade de ctDNA presente nos fluidos biológicos é uma das maiores limitações na implementação da sua análise na prática clínica ⁶⁴. De referir que a sua libertação reflete o volume da massa tumoral e estadio da doença ^{6,64}. De acordo com um estudo realizado por Bettegowda et al. ⁶⁵ que incluiu 640 doentes com diferentes tipos de cancro, a concentração média de ctDNA pode aumentar em 100 vezes em doentes com cancro em estadio IV comparativamente ao estadio I da doença. Assim, tendo em conta que as amostras 4P, 6P e 10P correspondem a doentes com PDAC em estadio IV, seria expectável que a quantidade de ctDNA presente no sangue permitisse a deteção da mutação *KRAS* G12V detetada no tecido tumoral. Contudo, ainda que tal hipótese seja verdadeira e a quantidade de ctDNA na amostra não seja limitante, a frequência do alelo mutado é afetada pela heterogeneidade tumoral que, aliada ao cfDNA não-tumoral, pode resultar num background de cfDNA *KRAS* wt que

impossibilite a detecção do alelo mutado, por se encontrar abaixo do limite de detecção do ARMS/HRMA⁶⁴.

A natureza altamente fragmentada do ctDNA constitui outros dos desafios para a sua detecção. A redução do número de moléculas de DNA intactas interfere não só na detecção de determinadas alterações genéticas, mas também na aplicação de determinadas metodologias de análise. Neste caso, a fragmentação das moléculas de ctDNA poderá resultar na redução do número de moléculas de DNA contendo o codão 12 de *KRAS* intacto, e explicar o insucesso do método na detecção da mutação *KRAS* G12V nas amostras de plasma analisadas. Por outro lado, tanto a SS como o ARMS/HRMA dependem do *annealing* de *primers* a locais específicos do DNA, pelo que, mesmo que todas as moléculas de ctDNA contendo o codão 12 de *KRAS* se encontrassem intactas, a perda dos locais de *annealing* dos *primers* inviabilizaria a sua análise.

Para além de todos os aspetos até agora discutidos, outros dos fatores com elevado impacto no sucesso dos métodos de análise de ctDNA diz respeito à sua extração. Tal como amplamente referido, a quantidade de ctDNA presente nos fluidos corporais é muito reduzida, pelo que os protocolos para a sua extração devem ser o mais eficientes possíveis para minimizar perdas e garantir a obtenção de ctDNA suficiente para posterior análise de alterações moleculares específicas de cancro.

Um dos aspetos a salientar tendo em conta o potencial impacto no insucesso do ARMS/HRMA diz respeito à associação entre o método de extração utilizado e a perda de fragmentos de menores dimensões. Um dos métodos mais amplamente usados em investigação para a extração de cfDNA tem por base o uso dos QIAamp DNA Blood Kits da Qiagen, maioritariamente o QIAamp DNA Blood Mini Kit (DBM kit), que, tal como o High Pure PCR Template Preparation Kit da Roche Diagnostics utilizado neste projeto, se baseia na extração de ácidos nucleicos com recurso a colunas com membranas de sílica na presença de sais caotrópicos^{66,67}. Ambos os kits foram desenvolvidos com o intuito de extrair DNA genómico de elevado peso molecular, e não ctDNA, cujo tamanho se encontra maioritariamente entre os 130 pb e 170 pb^{1,66}.

Com o aumento do interesse nas potencialidades do cfDNA surgiram no mercado kits específicos para o seu isolamento. Um estudo comparativo de Devonshire et al.⁶⁶ avaliou a eficiência de extração de DNA entre quatro desses kits e o DBM kit com recurso a fragmentos de aproximadamente 100 pb, 500 pb e 1500 pb. O DBM kit resultou na maior percentagem de isolamento do maior fragmento (58%), no entanto, este valor foi de apenas 38% e 21% para os fragmentos de 500 pb e 100 pb, respetivamente. Por outro lado, o QIAamp circulating nucleic acid kit da mesma empresa, desenvolvido para a extração de cfDNA, isolou 83% do menor fragmento e 99% do fragmento de 500 pb.

Transpondo as conclusões do estudo para este projeto, é possível inferir que, ainda que o método de extração utilizado seja adequado à extração de DNA a partir de amostras de tecido tumoral, o mesmo não se deverá aplicar à extração de ctDNA de amostras de plasma. Considerando o elevado nível de fragmentação caracterizador do cfDNA de doentes oncológicos, a perda de fragmentos de menores di-

mensões durante a extração poderá significar a perda de uma grande percentagem de fragmentos contendo a mutação de *KRAS* em análise, e consequentemente, impossibilitar a correta caracterização das amostras em estudo.

Uma das estratégias adotadas na tentativa de obter amostras de DNA mais concentradas foi a eluição com um volume reduzido de tampão de eluição (30 µL), o que, de acordo com alguns estudos, é insuficiente para saturar a membrana da coluna de extração, resultando no isolamento de menores quantidades de DNA. De acordo com os resultados reportados por Huang et al.⁶⁸ aquando da utilização do High Pure PCR Template Preparation Kit, as concentrações de DNA de amostras eluídas com 100 µL de tampão de eluição foram na generalidade comparáveis ou superiores às eluídas com 50 µL.

Em adição ao método de extração utilizado, outro dos aspetos a salientar é o volume de plasma a partir do qual foram realizadas as extrações de DNA, uma vez que, apesar de as amostras apresentarem um volume variável, na sua maioria este não excedia os 500 µL. Contudo, usualmente a extração de ctDNA é realizada a partir de pelo menos 1 mL de plasma, visto que, tal como expectável, a quantidade de DNA extraída aumenta com o aumento do volume de plasma, o que explica que os kits desenvolvidos especificamente para essa aplicação suportem a utilização de grandes volumes de plasma⁶⁶.

Considerando os aspetos apresentados, a metodologia selecionada para a extração de DNA das amostras de plasma não deverá ter sido a mais adequada, o que poderá justificar a não deteção da mutação *KRAS* G12V por ARMS/HRMA em amostras de plasma de doentes com tumores mutados.

Tabela 3.5. Comparação entre os resultados obtidos por SS e ARMS/HRMA para a deteção da mutação *KRAS* G12V em amostras tumorais e amostras de plasma correspondentes.

Doente	SS		ARMS/HRMA <i>KRAS</i> G12V	
	Tumor	Plasma	Tumor	Plasma
1	wt/G12D	wt/wt	ND	ND
4	wt/G12V	wt/wt	G12V	ND
6	wt/G12V	wt/wt	G12V	ND
7	wt/G12D	wt/wt	ND	ND
10	wt/G12V	wt/wt	ND	ND
11	wt/wt	wt/wt	ND	ND
13	wt/G12D	wt/wt	G12D	ND
16	wt/G12V	wt/G12V	-	G12V
17	wt/G12D	wt/wt	G12D	ND
23	wt/G12D	wt/wt	G12D	ND
28	wt/G12R	wt/wt	ND	ND
39	wt/wt	wt/wt	ND	ND
40	wt/wt	wt/wt	-	ND
43	wt/wt	wt/wt	-	ND
47	wt/wt	wt/wt	ND	ND
48	wt/G12D	wt/wt	G12D	ND

SS: Genótipo por Sequenciação de Sanger; ND: Alelo G12V não detetado; G12V: Amostra G12V/G12D positivas; - Sem dados.

3.4. ARMS/HRMA para detecção da mutação *KRAS* G12D

Após se ter verificado que a reação de ARMS/HRMA permite identificar amostras tumorais com a mutação *KRAS* G12V, a segunda mutação pontual mais comum em doentes com PDAC, a etapa seguinte teve como objetivo desenvolver uma reação capaz de detetar a mutação mais comum: *KRAS* G12D.

Para tal, tendo em conta que o método desenvolvido tem por base uma amplificação alelo-específica, foi necessário seleccionar um novo *primer* G12D-específico que difere do *primer* G12V-específico apenas no último nucleótido: adenina (G12D: GTT>GAT) em substituição da timina (G12V: GGT>GTT). Os *mismatches* formados pelo *annealing* do *primer* a diferentes mutações no mesmo codão de *KRAS* encontram-se sumarizados na Tabela 3.6.

Tabela 3.6. Hibridação do *primer* G12D-específico com diferentes alelos de *KRAS*.

	<i>Primer</i> G12D-específico
<i>KRAS</i> wt (GGT)	5' CTTGTGGTAGTTGGAGCT T A 3' III III III III III III III 3' GAACACCATCAACCTCGACC 5'
<i>KRAS</i> G12V (GGT>GTT)	5' CTTGTGGTAGTTGGAGCT T A 3' III III III III III III III 3' GAACACCATCAACCTCGACA 5'
<i>KRAS</i> G12D (GGT>GAT)	5' CTTGTGGTAGTTGGAGCT T A 3' III III III III III III III 3' GAACACCATCAACCTCGACT 5'
<i>KRAS</i> G12R (GGT>CGT)	5' CTTGTGGTAGTTGGAGCT T A 3' III III III III III III III 3' GAACACCATCAACCTCGAGC 5'
<i>KRAS</i> G12C (GGT>TGT)	5' CTTGTGGTAGTTGGAGCT T A 3' III III III III III III III 3' GAACACCATCAACCTCGAAC 5'

T: Nucleótido degenerado; **T**: Nucleótido G12D-específico.

3.4.1. ARMS/HRMA para detecção da mutação *KRAS* G12D em amostras tumorais de doentes com PDAC

A reação de ARMS/HRMA foi inicialmente realizada nas condições previamente otimizadas para a mutação G12V e com recurso à linhagem homozigótica wt SW48 e a seis amostras tumorais previamente caracterizadas por SS quanto à presença de mutações no codão 12 de *KRAS*: duas wt/wt (11T e 46T), uma wt/G12V (6T) e três wt/G12D (7T, 8T e 23T).

O ARMS/HRMA para a detecção do alelo G12D foi, em conformidade com o realizado para a mutação G12V, analisado com recurso ao perfil de desnaturação obtido para cada uma das amostras, e por eletroforese em gel de agarose com o intuito de avaliar a especificidade da amplificação, bem como detetar a eventual formação de dímeros de *primers* e produtos inespecíficos.

Na análise das curvas de desnaturação referentes às sete amostras testadas são claramente observados dois picos de desnaturação distintos, o primeiro por volta dos 75,5 °C e o segundo cerca de 4 °C acima, por volta dos 79 °C (Figura 3.16A). Contudo, estes não são observados nas curvas referentes a todas as amostras, uma vez que, tal como observado na Figura 3.16A, existem apenas três picos, correspondentes a três amostras analisadas (7T, 8T e 23T), por volta dos 79 °C, e seis (SW48, 6T, 7T, 8T, 11T e 46T) por volta dos 75,5 °C.

Em concordância com a metodologia de análise aplicada no ARMS/HRMA para detecção da mutação *KRAS* G12V, foi subtraída a curva de desnaturação da linhagem SW48, definida como referência, às curvas de desnaturação das restantes amostras, sendo assim obtidas as curvas de diferença que facilitam a diferenciação dos genótipos (Figura 3.16B). As curvas de diferença referentes às amostras tumorais wt/G12D 7T e 8T, representativas de amostras tumorais G12D positivas, apresentam inequivocamente ambos os picos de desnaturação. Por outro lado, as curvas de desnaturação referentes às amostras tumorais 6T, 11T e 46T, G12V negativas por SS, não apresentam o segundo pico de desnaturação por volta dos 79 °C. Esta observação indica que este pico de desnaturação é exclusivo de amostras G12D positivas, enquanto o primeiro pico por volta dos 75,5 °C aparenta ser independente do genótipo das amostras analisadas.

Deste modo, o ARMS/HRMA aparenta permitir distinguir entre amostras com a mutação *KRAS* G12D, que apresentam um pico de desnaturação por volta dos 79 °C, doravante designado Pico D, de amostras sem a mutação, que apresentam apenas um pico por volta dos 75,5 °C, doravante designado Pico W.

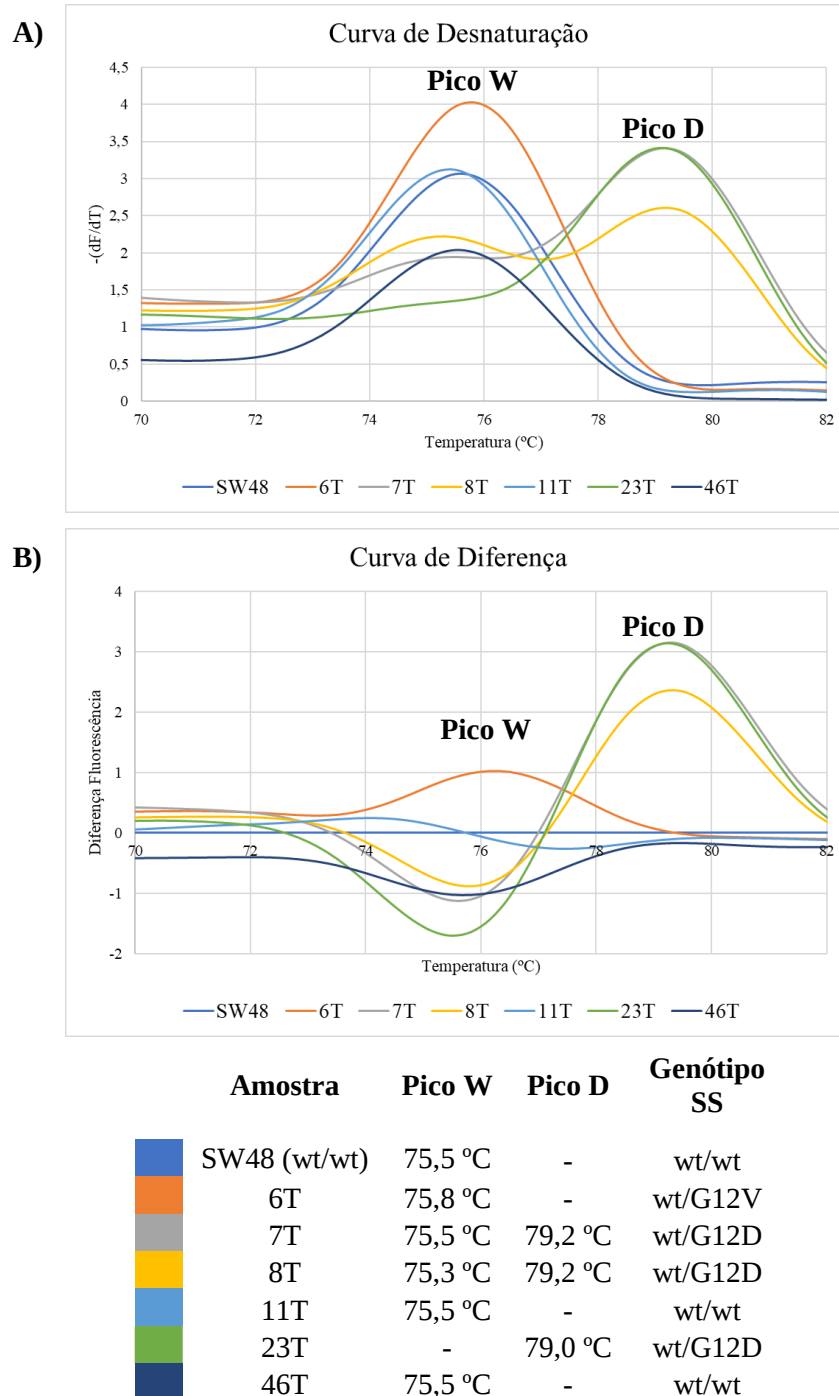


Figura 3.16. HRMA dos resultados de ARMS para deteção da mutação *KRAS* G12D na linhagem SW48 e nas amostras tumorais 6T, 7T, 8T, 11T, 23T e 46T de doentes com PDAC. Curvas de desnaturação (A) e Curvas de diferença (B), e respetivos picos de desnaturação e genótipos determinados por Sequenciação de Sanger (SS).

Seguidamente os produtos do ARMS/HRMA foram analisados por eletroforese em gel de agarose, e o gel obtido encontra-se representado na Figura 3.17A.

Tendo em conta que o produto de ARMS que se pretende amplificar é de 96 pb, a banda correspondente deverá ser visualizada no gel ligeiramente abaixo da primeira banda do marcador molecular, que corresponde ao menor fragmento de 100 pb. Contudo, as bandas correspondentes às amostras SW48 (wt/wt), 6T (wt/G12V), 11T (wt/wt) e 46T (wt/wt) (linhas 3, 4, 7 e 9, respetivamente), são visualizadas ligeiramente acima da primeira banda do marcador, pelo que aparentam ter mais do que 100 pb. Por outro lado, nas amostras wt/G12D 7T e 8T (linhas 5 e 6, respetivamente) são observadas duas bandas, uma com mais de 100 pb, em linha com o observado para as amostras G12D negativas, e outra com menos de 100 pb, concordante com o produto pretendido de 96 pb. Um resultado diferente foi obtido para a amostra wt/G12D 23T (linha 8), em que apenas a banda abaixo dos 100 pb é claramente visualizada.

Considerando o resultado obtido, e com o objetivo de esclarecer qual o produto inespecífico que resulta na banda acima dos 100 pb, foi analisada a complementaridade dos *primers* com o genoma humano com recurso à ferramenta Primer-BLAST. Para além do resultado correspondente ao produto de 96 pb para o qual a reação de ARMS foi desenvolvida, foi também obtido um resultado correspondente a um produto de 109 pb formado através da hibridação de dois *primers reverse* na região cromossómica 38.p13 referente ao gene que codifica a *Glutamate-rich protein 1* (ERICH1), e que, tendo em conta o tamanho do produto, poderá corresponder à banda observada. Esta hipótese não foi confirmada neste projeto, no entanto, de modo a melhor caracterizar o método desenvolvido, seria relevante isolar e sequenciar o produto correspondente.

Considerando que a banda abaixo de 100 pb é exclusiva das amostras wt/G12D (linhas 5, 6 e 8) e que o pico de desnaturação por volta dos 79 °C também o é, é possível inferir que a observação do Pico D nas curvas de desnaturação dessas amostras reflete a formação do produto de *KRAS* de 96 pb e a deteção do alelo G12D do gene. Por outro lado, a observação da banda inespecífica acima dos 100 pb é observada em todas as amostras (exceto a 23T), pelo que deverá corresponder ao Pico W, igualmente observado nas curvas de desnaturação de todas as amostras, com exceção da 23T.

Apesar de também ter sido caracterizada como wt/G12D por SS, a amostra 23T deverá apresentar uma percentagem de DNA mutado bastante superior às amostras 7T e 8T. Ao contrário das amostras 7T e 8T, cujo pico referente ao nucleótido adenina (alelo G12D) apresenta menor intensidade do que o referente à guanina (alelo wt), na amostra 23T é observado o inverso, o que releva a presença de maior quantidade do alelo G12D na amostra comparativamente ao alelo wt e às duas outras amostras (Figura 3.18).

Nas amostras G12D negativas SW48 (wt/wt), 6T (wt/G12V), 11T (wt/wt) e 46T (wt/wt), a formação do produto inespecífico será favorecida pela ausência do alelo G12D, sendo assim o único produto formando. Já nas amostras wt/G12D deverá ser formado não só o produto específico de 96 pb favorecido pela presença do alelo G12D, como, dependendo da percentagem de DNA mutado na amostra, o inespecífico (>100 pb) resultante do alelo wt.

Adicionalmente, na análise do gel de agarose (Figura 3.17A), são observadas bandas referentes a produtos de maior peso molecular, pelo que, com o objetivo de aumentar a especificidade da reação, esta foi realizada com uma temperatura de *annealing* superior no primeiro ciclo de amplificação: 54°C em vez dos 52°C previamente otimizados para a mutação G12V. Analisando o gel de agarose resultante (Figura 3.17B) é possível observar que o aumento da temperatura de *annealing* aparenta ter contribuído para a remoção dos produtos inespecíficos de maior peso molecular, ainda que não tenha permitido inibir completamente a sua formação. Contudo, esta observação não aparenta ser relevante neste caso, uma vez que, tal como na reação anteriormente descrita, a análise dos perfis de desnaturação permitiu novamente e muito claramente diferenciar as amostras quanto à presença do alelo G12D.

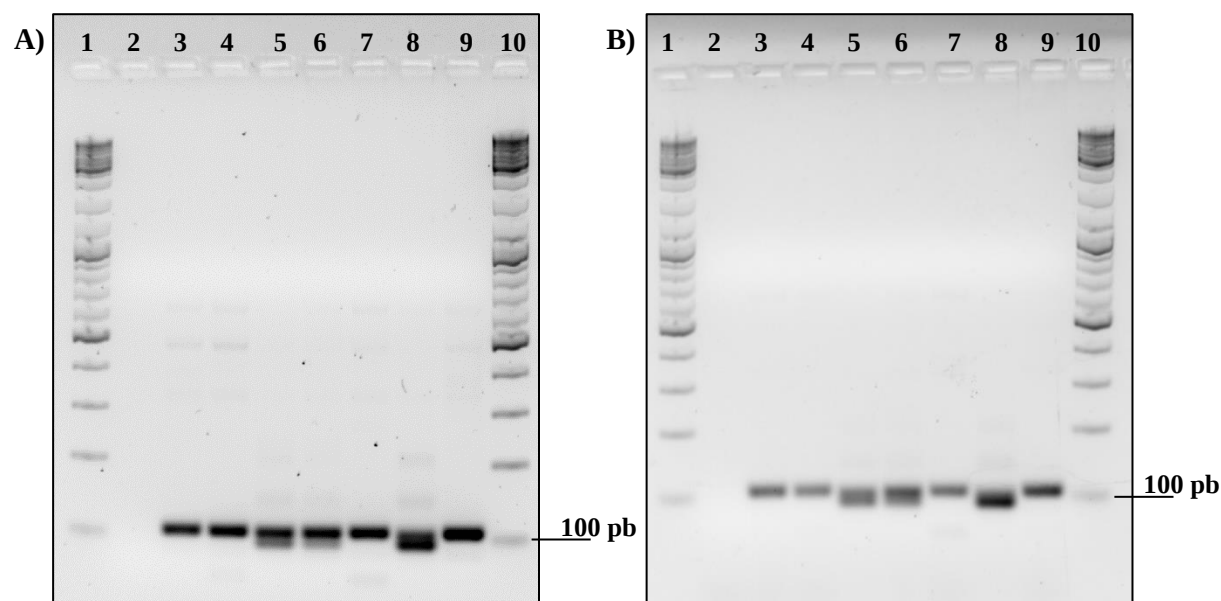


Figura 3.17. Eletroforese em Gel de Agarose para análise do ARMS G12D-específico. ARMS/HRMA com 52 °C (A) e 54 °C de temperatura de *annealing* na primeira fase de amplificação. 1- Marcador Molecular, 2- Controlo Negativo, 3- SW48, 4- 6T, 5- 7T, 6- 8T, 7- 11T, 8- 23T, 9- 46T, 10- Marcador Molecular.

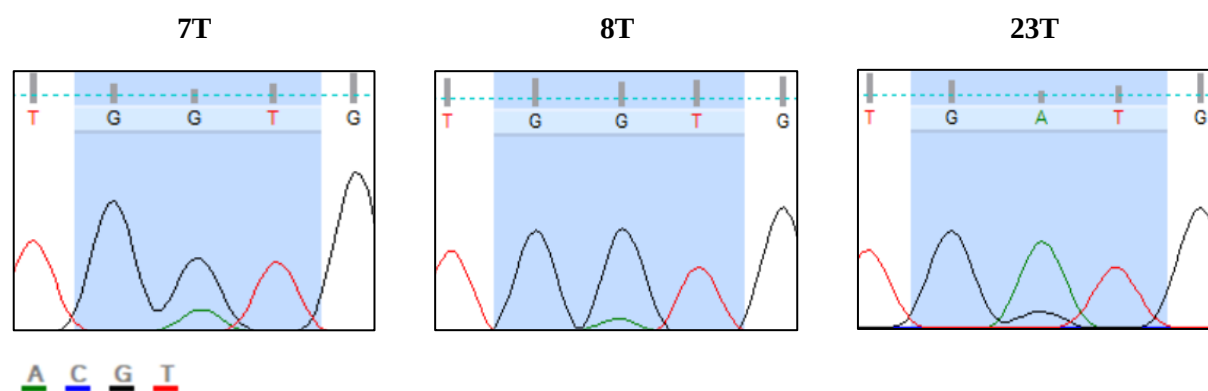


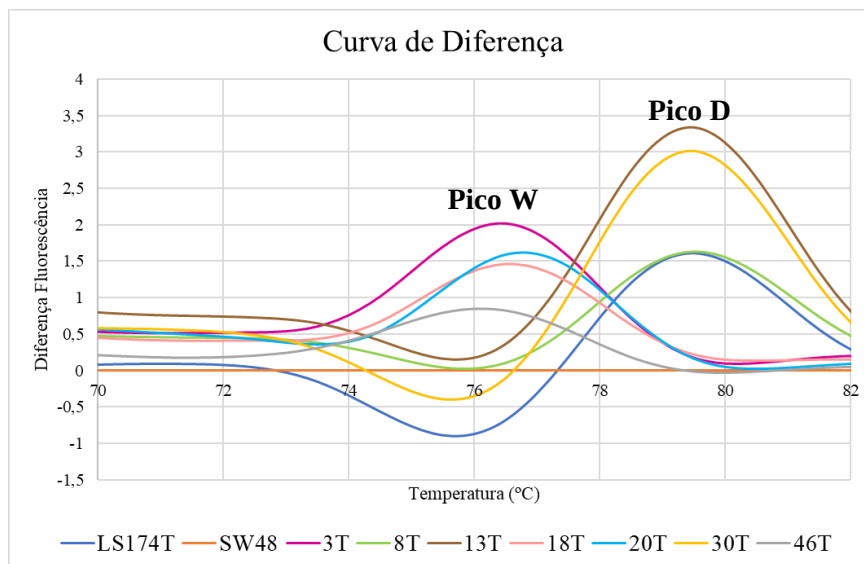
Figura 3.18. Análise das sequências do codão 12 de KRAS das amostras 7T, 8T e 23T obtidas por Sequenciação de Sanger.

Posteriormente foram analisadas cinco amostras tumorais adicionais. Devido à necessidade da incorporação de controlos em cada reação foi selecionada a linhagem heterozigótica wt/G12D LS174T como controlo G12D positivo e, em conformidade com o realizado até ao momento, a linhagem SW48 como controlo G12D negativo e referência para a obtenção das curvas de diferença. Adicionalmente foram também selecionadas como controlo as amostras tumorais 8T (wt/G12D) e 46T (wt/wt) previamente testadas. As curvas de diferença obtidas encontram-se representadas graficamente na Figura 3.19.

O controlo G12D positivo, linhagem LS174T, apresenta o Pico W (75,7 °C) e D (79,5 °C), o que corresponde ao expectável por ser wt/G12D, enquanto o controlo G12D negativo, linhagem SW48, apresenta apenas o Pico W (75,5 °C) correspondente ao produto inespecífico favorecido aquando da ausência do alelo G12D na amostra. Analisando os controlos tumorais, as amostras 8T e 46T apresentam um perfil de desnaturação concordante com o da linhagem LS174T e SW48, respetivamente. Deste modo, os resultados obtidos para os controlos da reação são os expectáveis, pelo que permitem validar os resultados relativos às novas amostras tumorais que se pretende analisar.

Em concordância com o obtido para a linhagem LS174T (controlo G12D), também as amostras wt/G12D 13T e 30T apresentaram um perfil de desnaturação caracterizado pela presença do Pico D, identificativo de amostras G12D positivas. Em oposição, a ausência do Pico D observada para a linhagem SW48 (controlo wt) é igualmente observada na amostra tumoral wt/wt 3T, bem como nas amostras wt/G12V 18T e wt/G12R 20T.

Por último, e tal como anteriormente demonstrado no contexto da mutação *KRAS* G12V, o ARMS/HRMA para deteção da mutação *KRAS* G12D aparenta ser específico para o alelo G12D para o qual o *primer forward* foi desenhado. Adicionalmente, a reprodutibilidade do método é evidenciada pela análise da linhagem SW48, bem como pelas amostras tumorais 8T e 46T, para as quais foi obtido o mesmo resultado nas duas reações de ARMS/HRMA apresentadas.



Amostra	Pico W	Pico D	Genótipo SS
LS174T (wt/G12D)	75,7 °C	79,5 °C	-
SW48 (wt/wt)	75,5 °C	-	-
3T	76,0 °C	-	wt/wt
8T	75,5 °C	79,5 °C	wt/G12D
13T	75,5 °C	79,5 °C	wt/G12D
18T	76,0 °C	-	wt/G12V
20T	76,3 °C	-	wt/G12R
30T	-	79,5 °C	wt/G12D
46T	75,8 °C	-	wt/wt

Figura 3.19. HRMA dos resultados de ARMS para detecção da mutação *KRAS* G12D na linhagem LS174T e nas amostras tumorais 3T, 8T, 13T, 18T, 20T, 30T e 46T de doentes com PDAC. Curvas de desnaturação das amostras, genótipo determinado por Sequenciação de Sanger (SS), e respetivos picos de desnaturação obtidos por HRMA.

A reação de ARMS/HRMA otimizada para detecção da mutação *KRAS* G12D foi testada num total de quarenta e quatro amostras tumorais de doentes com PDAC previamente caracterizadas por SS. Em todas as reações foram utilizadas as linhagens LS174T e SW48 como controlos positivo e negativo, respetivamente, sendo a segunda selecionada como curva de desnaturação de referência. Todas as amostras foram analisadas de igual forma, e, à semelhança do realizado para a mutação *KRAS* G12V, optei por apresentar os resultados com recurso a uma tabela resumo: Tabela 3.4.

À semelhança do que se verificou aquando da detecção da mutação *KRAS* G12V, o ARMS/HRMA detetou a mutação *KRAS* G12D em todas as amostras na qual esta foi detetada por SS, demonstrando assim a sua sensibilidade para a detecção da mutação em estudo. Das quarenta e quatro amostras analisadas, três geraram resultados não concordantes com o genótipo determinado por SS, tendo sido caracterizadas como G12D positivas.

3.4.1.1. Protocolo de análise de ARMS/HRMA para detecção da mutação *KRAS* G12D

Considerando a análise dos resultados de ARMS/HRMA descritos acima, e utilizando como referência os resultados obtidos por SS, foi estabelecido um protocolo para a identificação de amostras tumorais contendo a mutação *KRAS* G12D, designadas G12D positivas, pela metodologia de ARMS/HRMA desenvolvida:

- Realização do ARMS/HRMA de acordo com o descrito na secção 2.9;
- Obtenção da curva de desnaturação de cada amostra: derivada negativa da fluorescência (F) em relação à temperatura (T) ($-dF/dT$) em função da temperatura;
- Obtenção da curva de diferença de cada amostra: subtração da curva de desnaturação da linhagem SW48 (linhagem de referência), às curvas de desnaturação das restantes amostras;
- Validação da reação através da análise dos controlos selecionados (G12D positivos e G12D negativos) e segundo os critérios definidos:
 - **Amostra G12D positiva:** Apresentam um pico de desnaturação por volta dos 79 °C;
 - **Amostra G12V negativa:** Não apresentam um pico de desnaturação por volta dos 79 °C;
- Análise das curvas de diferença das amostras tumorais em análise segundo os critérios definidos acima.

3.4.2. ARMS/HRMA para detecção da mutação *KRAS* G12D em amostras de plasma de doentes com PDAC

Ainda que o ARMS/HRMA não tenha possibilitado a detecção da mutação *KRAS* G12V em amostras de ctDNA extraído de plasma, o método foi igualmente testado para a mutação G12D.

Em concordância com o procedimento realizado para a mutação G12V, foram selecionadas quatro amostras de plasma, 1P, 7P, 23P e 48P, cujas respetivas amostras tumorais foram caracterizadas como wt/G12D por SS e G12D positivas por ARMS/HRMA. Em adição, foram igualmente analisadas as amostras 6P, 11P e 28P, de doentes cujas amostras tumorais são wt/G12V, wt/wt e wt/G12R, respetivamente, por SS. As linhagens SW48 e LS174T foram utilizadas como controlo wt/referência e controlo mutado G12D, respetivamente, e as amostras tumorais 7T (wt/G12D) e 46T (wt/wt) foram analisadas como controlos adicionais da reação.

A reação de ARMS/HRMA foi realizada nas condições previamente otimizadas para a análise das amostras tumorais G12D positivas, e os resultados analisados segundo a mesma metodologia.

Após a obtenção das curvas de diferença de todas as amostras, representadas graficamente na Figura 3.20, e análise dos picos de desnaturação correspondentes, é evidente a existência de dois picos de desnaturação distintos, correspondentes aos Picos D e W anteriormente descritos.

Tal como expectável, a linhagem LS147T e a amostra tumoral 7T, ambas wt/G12D, apresentam um pico de desnaturação correspondente ao Pico D, ao contrário da linhagem SW48 e da amostra tumoral 46T, ambas wt/wt, o que está de acordo com a anteriormente demonstrada exclusividade do Pico D nas curvas de diferença de amostras G12D positivas.

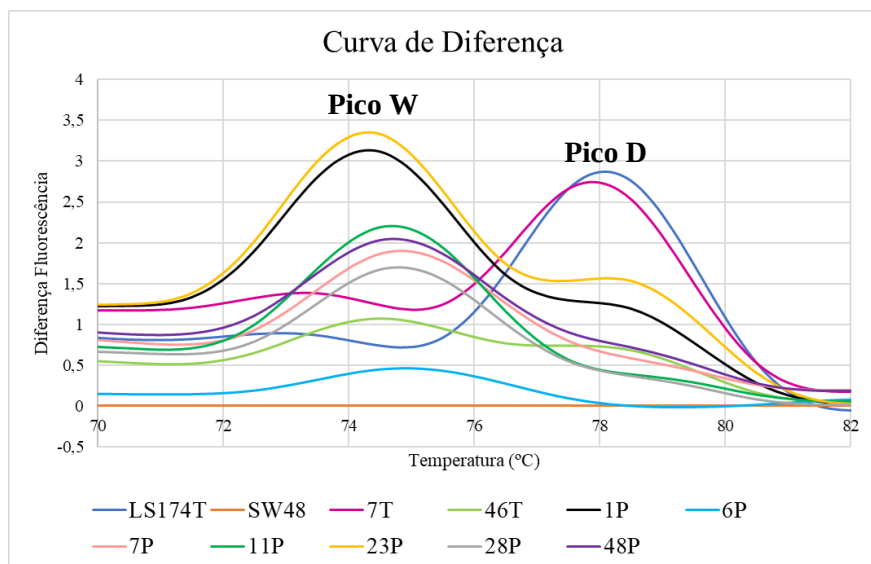
Seguindo o critério definido, as amostras 6P, 11P e 28P, não deveriam apresentar um pico de desnaturação correspondente ao pico D, característico de amostras com *KRAS* G12D, mas sim um pico de desnaturação na região dos +/- 75,5°C, referente ao anteriormente definido Pico W. Através da análise das curvas de diferença, bem como os valores de temperatura dos picos de desnaturação de cada uma das três amostras, é clara a observação de um pico de desnaturação correspondente ao Pico W, e a ausência do Pico D (Figura 3.20), o que permite concluir que nenhuma das amostras apresenta a mutação em estudo, em concordância com as respetivas amostras tumorais.

Por outro lado, por terem sido obtidas de doentes com tumores G12D positivos, é expectável que as amostras 1P, 7P, 23P e 48P apresentem ctDNA com *KRAS* G12D no plasma e, consequentemente, apresentem um perfil de desnaturação caracterizado pela observação do Pico D nas curvas de diferença correspondentes. Contudo, em concordância com o resultado da sequenciação, as amostras apresentam um perfil de desnaturação coincidente com o do controlo wt (SW48), sendo apenas evidente a existência de um pico de desnaturação correspondente ao Pico W (Figura 3.20).

Este resultado é particularmente inesperado para a amostra 23P, uma vez que, tal como discutido na secção anterior, o cromatograma da amostra tumoral correspondente (23T) revela a presença de uma percentagem elevada de células tumorais com a mutação G12D, que se deveria refletir em maior quantidade de ctDNA *KRAS* G12D em circulação, e deste modo possibilitar a sua deteção por ARMS/HRMA.

A reação de ARMS/HRMA para deteção da mutação *KRAS* G12D foi testada num total de dezasseis amostras de plasma de doentes com PDAC previamente caracterizadas por SS quanto à presença de mutações no codão 12 de *KRAS*, e os resultados obtidos encontram-se sumarizados na Tabela 3.7.

O insucesso do ARMS/HRMA na análise de ctDNA extraído de plasma foi amplamente discutido anteriormente na secção 3.3.5.



	Amostra	Pico W	Pico D	Genótipo Plasma SS	Genótipo Tumor SS
	LS174T (wt/G12D)	-	78,0 °C	-	-
	SW48 (wt/wt)	75,5 °C	-	-	-
	7T	-	77,8 °C	-	wt/G12D
	46T	74,8 °C	-	-	wt/wt
	1P	74,5 °C	-	wt/wt	wt/G12D
	6P	75,2 °C	-	wt/wt	wt/G12V
	7P	75 °C	-	wt/wt	wt/G12D
	11P	74,8 °C	-	wt/wt	wt/wt
	23P	75,5 °C	-	wt/wt	wt/G12D
	28P	75,0 °C	-	wt/wt	wt/G12R
	48P	74,8 °C	-	wt/wt	wt/G12D

Figura 3.20. HRMA dos resultados de ARMS para deteção da mutação *KRAS* G12D nas amostras de plasma 1P, 6P, 7P, 11P, 23P, 28P e 48P de doentes com PDAC. Curvas de diferença das amostras e respetivos picos de desnaturação. Genótipo das amostras determinado por Sequenciação de Sanger, e, no caso das amostras de plasma, genótipo das amostras tumorais correspondentes.

Tabela 3.7. Comparação entre os resultados obtidos por SS e ARMS/HRMA para a detecção da mutação *KRAS* G12D em amostras tumorais e amostras de plasma correspondentes.

Doente	SS		ARMS/HRMA <i>KRAS</i> G12D	
	Tumor	Plasma	Tumor	Plasma
1	wt/G12D	wt/wt	G12D	ND
4	wt/G12V	wt/wt	ND	ND
6	wt/G12V	wt/wt	ND	ND
7	wt/G12D	wt/wt	G12D	ND
10	wt/G12V	wt/wt	ND	ND
11	wt/wt	wt/wt	ND	ND
13	wt/G12D	wt/wt	G12D	ND
16	wt/G12V	wt/G12V	-	ND
17	wt/G12D	wt/wt	G12D	ND
23	wt/G12D	wt/wt	G12D	ND
28	wt/G12R	wt/wt	ND	ND
39	wt/wt	wt/wt	ND	ND
40	wt/wt	wt/wt	-	ND
43	wt/wt	wt/wt	-	ND
47	wt/wt	wt/wt	ND	ND
48	wt/G12D	wt/wt	G12D	ND

SS: Genótipo por Sequenciação de Sanger; ND: Alelo G12D não detetado; G12D: Amostra G12D positivas;
- Sem dados.

CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS

Este projeto teve como objetivo o desenvolvimento de uma nova metodologia para deteção das mutações *KRAS* G12V e *KRAS* G12D em amostras biológicas de doentes com PDAC, particularmente em amostras de plasma e de tecido tumoral recolhidas durante uma biópsia ou procedimento cirúrgico.

No âmbito da análise de amostras tumorais, a metodologia de ARMS/HRMA desenvolvida permitiu caracterizar todas as amostras wt/G12V e wt/G12D por SS como G12V e G12D positivas, respetivamente, demonstrando assim a sua sensibilidade para a deteção de ambas as mutações em amostras tumorais. Adicionalmente, os resultados obtidos são reveladores da reprodutibilidade do ARMS/HRMA, tal como demonstrado pela obtenção de perfis de desnaturação concordantes entre reações para as linhagens celulares SW48, SW480 e LS174T. A reprodutibilidade da metodologia desenvolvida é igualmente suportada pela repetição da análise de várias das amostras tumorais, que resultou em resultados concordantes entre reações.

Das quarenta e seis amostras tumorais analisadas por ARMS/HRMA, quatro geraram resultados distintos dos obtidos por sequenciação, tendo sido caracterizadas como G12D positivas (três amostras) e G12V positiva (uma amostra), apesar de nenhuns dos alelos ter sido detetado por sequenciação. A análise das amostras em causa foi realizada em três reações de ARMS/HRMA independentes. Ainda que o limite de deteção de ambas as técnicas, ARMS e HRMA, seja usualmente superior ao da SS, não é possível confirmar que os resultados obtidos para as quatro amostras representem falsos negativos por sequenciação e não falsos positivos por ARMS/HRMA.

Para além do desenvolvimento de uma metodologia para deteção das duas mutações de *KRAS* mais frequentemente detetadas em PDAC em amostras tumorais, outros dos objetivos do projeto desenvolvido consistia na deteção de ambas as mutações em ctDNA extraído de plasma. As amostras de plasma analisadas por SS e ARMS/HRMA resultaram em resultados concordantes para ambas as metodologias. Na determinação da sequência do codão 12 de *KRAS* das dezasseis amostras de plasma analisadas por SS e ARMS/HRMA, quinze foram caracterizadas como wt/wt, independentemente de pertencerem a doentes com amostras tumorais wt/G12V ou wt/G12D, como é o caso de nove das amostras analisadas. Apenas numa das amostras de plasma referentes a um doente com uma amostra tumoral wt/G12V foi detetado a mutação *KRAS* G12V.

A estratégia de ARMS/HRMA desenvolvida baseia-se na realização de um único procedimento laboratorial, amplificação por ARMS seguida de um passo de desnaturação, realizado num sistema fechado com recurso a um único equipamento. O trabalho laboratorial associado à análise por ARMS/HRMA consiste apenas na preparação de uma reação de ARMS com recurso a uma Master Mix, o que em muito difere dos vários procedimentos necessários para análise por sequenciação. A análise

dos resultados obtidos pode ser realizada imediatamente após o fim da reação com recurso ao software de análise do equipamento utilizado. Deste modo, a estratégia ARMS/HRMA desenvolvida destaca-se pela simplicidade do procedimento laboratorial e da análise dos resultados, bem como pela redução do tempo de resposta comparativamente a sequenciação, o método de referência para análise mutacional.

No âmbito da análise de amostras tumorais, o ARMS/HRMA demonstrou sensibilidade e especificidade para deteção das mutações *KRAS* G12V e *KRAS* G12D, ainda que quatro amostras tenham sido caracterizadas como G12V ou G12D positivas sem confirmação por sequenciação. Considerando os resultados obtidos, e a facilidade de execução do procedimento laboratorial, a estratégia ARMS/HRMA desenvolvida apresenta potencial para aplicação em análise *médium-throughput* para deteção das duas mutações de *KRAS* mais frequentes em PDAC em amostras tumorais.

Contrariamente, a estratégia ARMS/HRMA não demonstrou a mesma sensibilidade para a análise de ctDNA extraído de plasma, não tendo possibilitado a deteção das mutações em análise mesmo em amostras referentes a doentes com PDAC metastático com tumores primários mutados. Deste modo, esta não demonstrou ser uma metodologia vantajosa para a análise mutacional de *KRAS* em ctDNA extraído de plasma para monitorização do PDAC e identificação de doentes com maior risco de recorrência.

No futuro, de modo a testar mais amplamente a reprodutibilidade, sensibilidade e especificidade do ARMS/HRMA para a deteção das mutações *KRAS* G12V e G12D em amostras tumorais, deveria ser analisado um maior número de amostras obtidas de doentes com PDAC em diferentes estadios da doença. Adicionalmente, por ser a terceira mutação mais comum em *KRAS* no PDAC, seria relevante desenvolver uma nova reação para a deteção do alelo G12R através da seleção de um novo *primer* G12R-específico e seguindo a mesma metodologia já desenvolvida para os alelos G12V e G12D.

A percentagem de casos diagnosticados num estadio avançado é refletida na reduzida taxa de sobrevivência associada ao PDAC, realidade agravada pelo atraso no diagnóstico, e consequentemente pelo atraso no início do tratamento, associado a resultados inconclusivos e resultados negativos por citopatologia em doentes com apresentação clínica indicativa de cancro pancreático. Considerando que a deteção de mutações em *KRAS* é reveladora de lesões pancreáticas malignas, a rápida deteção de mutações no gene em amostras tumorais contribui para facilitar e acelerar o diagnóstico de PDAC. Neste âmbito, o tempo de resposta associado ao ARMS/HRMA para deteção de mutações em *KRAS* em amostras tumorais, bem como a sensibilidade demonstrada, poderá ser uma mais-valia aquando do diagnóstico diferencial de PDAC.

Em adição, a análise mutacional de *KRAS* poderá vir a ser essencial para guiar os clínicos na escolha da estratégia terapêutica mais adequada a cada doente. Tendo em conta o panorama devastador associado ao cancro pancreático, muitos esforços têm sido feitos no sentido de desenvolver opções terapêuticas direcionadas para a proteína *KRAS* mutada, contudo, até ao momento, nenhum dos inibidores analisados permitiu melhorar substancialmente o prognóstico de PDAC, pelo que não são aplicados na clínica^{29,69}. Ainda assim, muitos estudos continuam a ser realizados nesse sentido, pelo que no futuro a

identificação de doentes com PDAC com mutações específicas em *KRAS* poderá vir a ser essencial para a correta seleção terapêutica. Do mesmo modo, a análise mutacional de *KRAS* poderá vir a ser implementada pelo desenvolvimento de novas terapias que apresentem benefícios apenas em pacientes com *KRAS* wt, como é o caso dos anticorpos monoclonais anti-EGFR no contexto do cancro colorretal metastático ⁵².

Para além do seu potencial no diagnóstico e seleção de terapias direcionadas aquando do seu desenvolvimento e aplicação na prática clínica, a deteção de mutações em *KRAS* apresenta potencial para monitorização do PDAC, nomeadamente para antecipar a recorrência da doença, bem como identificar doentes que beneficiariam de intensificação do tratamento. Neste âmbito, tendo em conta a facilidade da realização de uma colheita de sangue, a análise mutacional de *KRAS* em ctDNA extraído de plasma é extremamente vantajosa, uma vez que poderia ser realizada frequentemente para monitorização da progressão da doença e da resposta ao tratamento.

Neste sentido, um dos objetivos deste projeto consistia no desenvolvimento de uma metodologia que permitisse a deteção das duas mutações de *KRAS* mais comuns em PDAC através da análise de ctDNA extraído de plasma. Contudo, apesar de o ARMS/HRMA desenvolvido se ter revelado bem-sucedido na análise de amostras tumorais, o mesmo não se verificou para as amostras de plasma.

O insucesso do ARMS/HRMA na análise de ctDNA poderá estar associado à utilização de um método de extração pouco eficiente na extração de DNA altamente fragmentado. Deste modo, e tendo em conta a sensibilidade do ARMS/HRMA na análise de DNA extraído de amostras tumorais, seria interessante testar novamente o método na análise de ctDNA extraído de plasma com recurso a um dos kits de extração de cfDNA disponíveis no mercado, vantajosos por permitirem que a extração seja rápida e padronizada. Em adição, de forma a maximizar a quantidade de ctDNA presente na amostra, outros dos aspetos a considerar num novo estudo seria a utilização de maior volume de plasma para extração.

5. REFERÊNCIAS

1. Siravegna, G. et al. How liquid biopsies can change clinical practice in oncology. *Annals of Oncology* 30, 1580-1590 (2019).
2. De Angelis, R. et al. Cancer survival in Europe 1999–2007 by country and age: results of EURO-CARE-5—a population-based study. *The Lancet Oncology* 15, 23-34 (2014).
3. United European Gastroenterology (UEG). Pancreatic Cancer Across Europe. Taking a united stand. *UEG-United Eur. Gastroenterol.* 20 (2018).
4. Vareedayah, A., Alkaade, S. & Taylor, J. Pancreatic Adenocarcinoma. *Missouri Medicine* 115, 230-235 (2018)
5. Types of pancreatic cancer - Pancreatic Cancer UK (2021). Disponível em: <https://www.pancreaticcancer.org.uk/information/just-diagnosed-with-pancreatic-cancer/pancreatic-ductal-adenocarcinoma-and-other-exocrine-tumours/>.
6. Heredia-Soto, V., Rodríguez-Salas, N. & Feliu, J. Liquid Biopsy in Pancreatic Cancer: Are We Ready to Apply It in the Clinical Practice?. *Cancers* 13, 1986 (2021).
7. Oliveira, T. Cancro: “Não falamos de algo longínquo. É o presente”. *Expresso* (2021).
8. Tempero, M. et al. Pancreatic Adenocarcinoma, Version 2.2021, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *National Comprehensive Cancer Network* 19, 439-457 (2021).
9. Shackelford, R., Whitling, N., McNab, P., Japa, S. & Coppola, D. KRAS Testing: A Tool for the Implementation of Personalized Medicine. *Genes & Cancer* 3, 459-466 (2012).
10. Buscail, L., Bournet, B. & Cordelier, P. Role of oncogenic KRAS in the diagnosis, prognosis and treatment of pancreatic cancer. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 17, 153-168 (2020).
11. Jančík, S., Drábek, J., Radzioch, D. & Hajdúch, M. Clinical Relevance of KRAS in Human Cancers. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010, 1-13 (2010).
12. László, L. et al. Recent Updates on the Significance of KRAS Mutations in Colorectal Cancer Biology. *Cells* 10, 667 (2021).
13. Bryant, K., Mancias, J., Kimmelman, A. & Der, C. KRAS: feeding pancreatic cancer proliferation. *Trends in Biochemical Sciences* 39, 91-100 (2014).
14. Cancro do pâncreas - SNS24 (2020). Disponível em: <https://www.sns24.gov.pt/tema/doencas-oncologicas/tipos-de-cancro/cancro-do-pancreas/#sec-6>.
15. Sanjeevi, S. et al. Impact of delay between imaging and treatment in patients with potentially curable pancreatic cancer. *British Journal of Surgery* 103, 267-275 (2015).
16. Savides, T. et al. EUS-guided FNA diagnostic yield of malignancy in solid pancreatic masses: a benchmark for quality performance measurement. *Gastrointestinal Endoscopy* 66, 277-282 (2007).
17. Buscail, E. et al. Liquid Biopsy Approach for Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancers* 11, 852 (2019).
18. Fuccio, L. et al. The role of K-ras gene mutation analysis in EUS-guided FNA cytology specimens for the differential diagnosis of pancreatic solid masses: a meta-analysis of prospective studies. *Gastrointestinal Endoscopy* 78, 596-608 (2013).
19. Bournet, B. et al. Endoscopic Ultrasound-guided Fine-Needle Aspiration Biopsy Coupled With a KRAS Mutation Assay Using Allelic Discrimination Improves the Diagnosis of Pancreatic Cancer. *Journal of Clinical Gastroenterology* 49, 50-56 (2015).
20. Trisolini, E. et al. KRAS mutation testing on all non-malignant diagnosis of pancreatic endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration biopsies improves diagnostic accuracy. *Pathology* 49, 379-386 (2017).
21. Dumonceau, J. et al. Indications, results, and clinical impact of endoscopic ultrasound (EUS)-guided sampling in gastroenterology: European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE) Clinical Guideline – Updated January 2017. *Endoscopy* 49, 695-714 (2017).
22. Mandel, P., Metais, P. Nuclear Acids In Human Blood Plasma. *C. R. Seances Soc. Biol. Fil* 142,

- 241–243 (1948).
23. Leon, S. A., Shapiro, B., Sklaroff, D. M. & Yaros, M. J. Free DNA in the Serum of Cancer Patients and the Effect of Therapy. *Cancer Res.* 37, 646–650 (1977).
 24. Jahr, S. *et al.* DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: Quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res.* 61, 1659–1665 (2001).
 25. Stroun, M., Lyautey, J., Lederrey, C., Olson-Sand, A. & Anker, P. About the possible origin and mechanism of circulating DNA. *Clinica Chimica Acta* 313, 139–142 (2001).
 26. Ballehaninna, U. K. & Chamberlain, R. S. The clinical utility of serum CA 19-9 in the diagnosis, prognosis and management of pancreatic adenocarcinoma: An evidence based appraisal. *J. Gastrointest. Oncol.* 3, 105–119 (2012).
 27. Löhr, M., Klöppel, G., Maisonneuve, P., Lowenfels, A. & Lüttges, J. Frequency of K-ras Mutations in Pancreatic Intraductal Neoplasias Associated with Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Chronic Pancreatitis: A Meta-Analysis. *Neoplasia* 7, 17–23 (2005).
 28. Yachida, S. *et al.* Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer. *Nature* 467, 1114–1117 (2010).
 29. Patel, N. *et al.* The Diagnostic Accuracy of Mutant KRAS Detection from Pancreatic Secretions for the Diagnosis of Pancreatic Cancer: A Meta-Analysis. *Cancers* 12, 2353 (2020).
 30. Kaissis, G. & Braren, R. Pancreatic cancer detection and characterization—state of the art cross-sectional imaging and imaging data analysis. *Translational Gastroenterology and Hepatology* 4, 35–35 (2019).
 31. Cohen, J. *et al.* Combined circulating tumor DNA and protein biomarker-based liquid biopsy for the earlier detection of pancreatic cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114, 10202–10207 (2017).
 32. Lee, B. *et al.* Circulating tumor DNA as a potential marker of adjuvant chemotherapy benefit following surgery for localized pancreatic cancer. *Annals of Oncology* 30, 1472–1478 (2019).
 33. Grunvald, M. W., Jacobson, R. A., Kuzel, T. M., Pappas, S. G. & Masood, A. Current status of circulating tumor dna liquid biopsy in pancreatic cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 1–15 (2020).
 34. Sausen, M. *et al.* Clinical implications of genomic alterations in the tumour and circulation of pancreatic cancer patients. *Nature Communications* 6, 7686 (2015).
 35. Däbritz, J., Preston, R., Hänfler, J. & Oettle, H. Follow-Up Study of K-ras Mutations in the Plasma of Patients With Pancreatic Cancer. *Pancreas* 38, 534–541 (2009).
 36. Groot, V. *et al.* Circulating Tumor DNA as a Clinical Test in Resected Pancreatic Cancer. *Clinical Cancer Research* 25, 4973–4984 (2019).
 37. Hadano, N. *et al.* Prognostic value of circulating tumour DNA in patients undergoing curative resection for pancreatic cancer. *British Journal of Cancer* 115, 59–65 (2016).
 38. Lee, J. S. *et al.* Circulating tumor DNA as a prognostic indicator in resectable pancreatic ductal adenocarcinoma: A systematic review and meta-analysis. *Sci. Rep.* 9, 1–7 (2019).
 39. Yamaguchi, T. *et al.* Clinical Implications of Pre- and Postoperative Circulating Tumor DNA in Patients with Resected Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Ann. Surg. Oncol.* 28, 3135–3144 (2021).
 40. Tsiatis, A. *et al.* Comparison of Sanger Sequencing, Pyrosequencing, and Melting Curve Analysis for the Detection of KRAS Mutations. *The Journal of Molecular Diagnostics* 12, 425–432 (2010).
 41. Mullis, K. *et al.* Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 51, 263–273 (1986).
 42. Klein, D. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends in Molecular Medicine* 8, 257–260 (2002).
 43. Wittwer, C., Herrmann, M., Moss, A. & Rasmussen, R. Continuous Fluorescence Monitoring of Rapid Cycle DNA Amplification. *BioTechniques* 54, 314–320 (2013).
 44. Heid, C., Stevens, J., Livak, K. & Williams, P. Real time quantitative PCR. *Genome Research* 6, 986–994 (1996).
 45. Tyagi, S. & Kramer, F. Molecular Beacons: Probes that Fluoresce upon Hybridization. *Nature Biotechnology* 14, 303–308 (1996).
 46. Newton, C. *et al.* Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Research* 17, 2503–2516 (1989).

47. Old, J. M. Protocols in Human Molecular Genetics. em *Protocols in Human Molecular Genetics* (ed. Christopher G. Mathew) 9, 77–84 (Humana Press, 1991).
48. Daher, R., Stewart, G., Boissinot, M. & Bergeron, M. Recombinase Polymerase Amplification for Diagnostic Applications. *Clinical Chemistry* 62, 947-958 (2016).
49. Cross, J. DxS Ltd. *Pharmacogenomics* 9, 463–467 (2008).
50. Thelwell, N. Mode of action and application of Scorpion primers to mutation detection. *Nucleic Acids Research* 28, 3752-3761 (2000).
51. Franklin, W. et al. KRAS Mutation: Comparison of Testing Methods and Tissue Sampling Techniques in Colon Cancer. *The Journal of Molecular Diagnostics* 12, 43-50 (2010).
52. Amado, R. et al. Wild-Type KRAS Is Required for Panitumumab Efficacy in Patients With Metastatic Colorectal Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 26, 1626-1634 (2008).
53. Linardou, H. et al. All about KRAS for clinical oncology practice: Gene profile, clinical implications and laboratory recommendations for somatic mutational testing in colorectal cancer. *Cancer Treatment Reviews* 37, 221-233 (2011).
54. Ririe, K., Rasmussen, R. & Wittwer, C. Product Differentiation by Analysis of DNA Melting Curves during the Polymerase Chain Reaction. *Analytical Biochemistry* 245, 154-160 (1997).
55. Ibrahim, S. et al. Comparative analysis of pyrosequencing and QMC-PCR in conjunction with high resolution melting for KRAS/BRAF mutation detection. *International Journal of Experimental Pathology* 91, 500-505 (2010).
56. Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74, 5463-5467 (1977).
57. Brown, T. A. *Genomes* 3. 103-132 (Garland Publishing Inc, 2006).
58. Heather, J. & Chain, B. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics* 107, 1-8 (2016).
59. Malapelle, U. et al. Sanger sequencing in routine KRAS testing: a review of 1720 cases from a pathologist's perspective. *Journal of Clinical Pathology* 65, 940-944 (2012).
60. Tol, J. et al. High sensitivity of both sequencing and real-time PCR analysis of KRAS mutations in colorectal cancer tissue. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 14, 2122-2131 (2009).
61. Siegel, R., Miller, K., Fuchs, H. & Jemal, A. Cancer Statistics, 2021. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 71, 7-33 (2021).
62. Berg, K. et al. Multi-omics of 34 colorectal cancer cell lines - a resource for biomedical studies. *Molecular Cancer* 16, (2017).
63. Huang, M., Arnheim, N. & Goodman, M. Extension of base mispairs by TaqDNA polymerase: implications for single nucleotide discrimination in PCR. *Nucleic Acids Research* 20, 4567-4573 (1992).
64. Gorgannezhad, L., Umer, M., Islam, M., Nguyen, N. & Shiddiky, M. Circulating tumor DNA and liquid biopsy: opportunities, challenges, and recent advances in detection technologies. *Lab on a Chip* 18, 1174-1196 (2018).
65. Bettegowda, C. et al. Detection of Circulating Tumor DNA in Early- and Late-Stage Human Malignancies. *Science Translational Medicine* 6, 224ra24 (2014).
66. Devonshire, A. et al. Towards standardisation of cell-free DNA measurement in plasma: controls for extraction efficiency, fragment size bias and quantification. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 406, 6499-6512 (2014).
67. Fleischhacker, M. et al. Methods for isolation of cell-free plasma DNA strongly affect DNA yield. *Clinica Chimica Acta* 412, 2085-2088 (2011).
68. Huang, D., Mergenthaler-Gatfield, S., Hahn, S., Holzgreve, W. & Zhong, X. in *Methods in Molecular Biology: Prenatal Diagnosis* 203-208 (Humana Press, 2008).
69. Luchini, C. et al. KRAS wild-type pancreatic ductal adenocarcinoma: molecular pathology and therapeutic opportunities. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 39, (2020).

6.

APÊNDICE

Tabela 6.1. Concentração do DNA extraído das amostras tumorais e de plasma.

Amostra	Concentração (ng/μL)	Amostra	Concentração (ng/μL)
1T	77,1	1P	43,0
3T	59,0	4P	59,4
4T	12,4	6P	17,0
5T	48,2	7P	30,1
6T	16,0	11P	31,3
7T	26,0	13P	30,4
8T	15,0	16P	25,0
9T	218,0	17P	32,2
10T	14,0	21P	20,3
11T	10,9	23P	25,6
12T	16,0	25P	40,2
13T	89,0	28P	24,7
16T	48,4	34P	16,3
17T	57,4	39P	33,7
18T	190,0	40P	27,3
20T	18,0	43P	21,8
21T	23,2	46P	26,4
23T	36,0	47P	28,3
28T	40,0	48P	54,6
30T	114,5	58P	2,50
31T	61,4	59P	7,50
35T	56,0	65P	13,7
36T	65,9	66P	7,8
37T	7,2	69P	15,1
38T	33,1	73P	4,7
39T	98,1	74P	11,7
46T	21,0	75P	9,9
47T	37,0	78P	12,1
48T	100,0	79P	12,6
58T	16,2	81P	6,2
59T	912,0	83P	4,0
65T	243,5	84P	7,3
66T	715,8	88P	8,2
69T	273,5	89P	7,2
73T	112,9	90P	19,3
74T	29,4	93P	15,1
75T	750,0	98P	13,0
78T	186,9	100P	12,0
79T	249,9		
81T	225,9		
83T	352,1		
84T	577,3		
88T	656,2		
89T	58,4		
90T	420,0		
93T	369,6		
98T	5,7		
100T	5,1		



