UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Medicina

Bianca Gomes Fernandes

AVALIAÇÃO DE ALTERAÇÕES MOLECULARES EM PACIENTES COM CÂNCER COLORRETAL (CCR) E APLICABILIDADE NA TÉCNICA DE BIÓPSIA LÍQUIDA

Belo Horizonte
2022

Bianca Gomes Fernandes

AVALIAÇÃO DE ALTERAÇÕES MOLECULARES EM PACIENTES COM CÂNCER COLORRETAL (CCR) E APLICABILIDADE NA TÉCNICA DE BIÓPSIA LÍQUIDA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Molecular da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Medicina Molecular.

Orientadora: Profª. Drª. Luciana Bastos Rodrigues.

Coorientador: Prof. Dr. Luiz Armando De Marco.

Belo Horizonte

2022

Fernandes, Bianca Gomes.
F363a Avaliação de alterações moleculares em pacientes com Câncer Colorretal (CCR) e aplicabilidade na Técnica de Biópsia Líquida [recursos eletrônicos]. / Bianca Gomes Fernandes. - - Belo Horizonte: 2022.
71f.: il.
Formato: PDF.
Requisitos do Sistema: Adobe Digital Editions.

Orientador (a): Luciana Bastos Rodrigues.
Coorientador (a): Luiz Armando de Marco.
Área de concentração: Medicina Molecular
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Biomarcadores. 2. Biópsia Líquida. 3. Neoplasias Colorretais. 4. Técnicas de Amplificação de Ácido Nucleico. 5. Dissertação Acadêmica. I Rodrigues, Luciana Bastos. II. Marco, Luiz Armando de. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WI 529

Bibliotecário responsável: Fabian Rodrigo dos Santos CRB-6/2697

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA MOLECULAR

FOLHA DE APROVAÇÃO

AVALIAÇÃO DE ALTERAÇÕES MOLECULARES EM PACIENTES COM CÂNCER COLORRETAL (CCR) E APLICABILIDADE NA TÉCNICA DE BIÓPSIA LÍQUIDA

BIANCA GOMES FERNANDES

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia vinte e cinco de fevereiro de dois mil vinte e dois, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação Medicina Molecular da Universidade Federal de Minas Gerais constituída pelas seguintes professoras doutoras:

Luciana Bastos Rodrigues - Orientadora
UFMG

Carolina Cavaliéri Gomes
UFMG

Juliana Garcia Carneiro
Clínica Personal

Belo Horizonte, 25 de fevereiro de 2022.

Documento assinado eletronicamente por **Juliana Garcia Carneiro**, **Usuário Externo**, em 03/03/2022, às 12:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Carolina Cavalieri Gomes**, **Professora do Magistério Superior**, em 03/03/2022, às 14:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Luciana Bastos Rodrigues**, **Professora do Magistério Superior**, em 03/03/2022, às 15:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1262812** e o código CRC **9688B093**.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me permitir vivenciar grandes experiências, colocando em minha trajetória pessoas admiráveis, às quais merecem minha gratidão.

Aos meus pais Vilma e Isnar, e, aos meus irmãos Maria Eduarda e Bernardo, que muito me apoiaram, impulsionando-me a trilhar este caminho da melhor maneira possível.

À minha querida orientadora Luciana Bastos Rodrigues, um grande exemplo, que me ensinou mais que ciência, demonstrando que grandes cientistas são, antes de tudo, grandes seres humanos.

Ao meu admirável coorientador Luiz Armando De Marco, por seus sábios conselhos, por viabilizar a realização do estudo e compartilhar seu vasto conhecimento.

Aos alunos de iniciação científica Ana Luiza, Frederico, Kethelyn, Marcela, Pedro e Phellipe, integrantes do estudo, que muito contribuíram com o desenvolvimento da pesquisa.

À equipe de Coloproctologia do Hospital das Clínicas da UFMG, por possibilitarem o delineamento proposto e inclusão do público-alvo.

Ao Laboratório Personal Diagnósticos de Precisão e, em especial, à Juliana Garcia Carneiro e a Pâmella Zorzan de Oliveira, por ampliarem os horizontes da pesquisa.

À professora Simone de Vasconcelos Generoso e à doutoranda Luísa Martins Trindade, pela parceria ao longo da pesquisa.

Ao brilhante professor Renan Pedra de Souza, por compartilhar seu conhecimento e contribuir profundamente com o estudo.

À equipe do projeto LabEst, em especial, a professora Thais Rotsen Correa, por sua participação construtiva na pesquisa.

Aos solícitos pacientes participantes do estudo, razão principal pela elaboração e realização desta pesquisa.

Às amizades construídas nos ambientes de execução da pesquisa, que pretendo cativar por toda vida.

A todos os membros do Laboratório de Medicina Molecular da FM-UFMG que, de forma direta e/ou indireta, colaboraram para a concretização do estudo.

Aos meus inspiradores professores da graduação, que despertaram em mim admiração e profundo interesse pela carreira acadêmica.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por apoiar a realização deste estudo.

“Nossa maior fraqueza está em desistir.

O caminho mais certo de vencer é tentar mais uma vez”

Thomas Edison

RESUMO

O câncer colorretal (CCR) é um dos principais responsáveis pelas causas de morbidade e mortalidade no mundo. De forma majoritária, a detecção prévia à metástase e aplicação terapêutica adequada conduzem para maior sobrevida e qualidade de vida dos pacientes. Contudo, o diagnóstico e a vigilância pós-operatória são circundados por limitações, que confluem para a alta mortalidade computada. A detecção de biomarcadores genéticos e melhor aplicabilidade deles na prática são fatores influentes, que contribuem para desfechos clínicos favoráveis. Para entender melhor as bases moleculares associadas ao CCR, investigou-se os genes *KRAS, NRAS, BRAF, EGFR* e *TP53* no DNA de células tumorais e saudáveis, por meio de sequenciamento de Sanger. A alteração mais frequente, presente apenas no DNA tumoral (somática), foi utilizada para averiguar, a partir de PCR Digital (ddPCR), a detecção e análise do DNA tumoral circulante (ctDNA) no plasma. Ao todo, 42 indivíduos compuseram o estudo, sendo eles, majoritariamente, do gênero masculino (59,5%), com idade média de 63 anos (DP: 10,0; mín: 41; máx: 83) e tumores localizados no cólon ascendente (21,4%), transverso (2,4%), descendente (4,8%), sigmóide (33,3%) e no reto (38,1%). Variantes alélicas germinativas e somáticas foram encontradas nos exons *KRAS*, *EGFR* e *TP53*. A alteração somática mais frequente do estudo foi a *rs121913529* (*KRAS* - G12V, G12A e G13D) que demonstrou associação estatisticamente significativa com o etilismo (p = 0,002). Também envolvendo alterações somáticas, observou-se que pacientes com mutação somática em TP53 possuem dez vezes maior chance de irem a óbito, em comparação com a chance daqueles sem mutação nesse gene supressor de tumor (OR 11,2; IC 95% 1,25 - 245). A aplicabilidade dessas alterações somáticas na técnica de biópsia líquida foi demonstrada pela positividade da *rs121913529* no ctDNA plasmático, por ddPCR. Por conseguinte, os resultados obtidos ampliam a compreensão das bases moleculares do CCR e apresentam uma otimização da técnica de biópsia líquida, oportuna à prática clínica.

Palavras-chave: Biomarcadores, biópsia líquida, *BRAF*, câncer colorretal, ctDNA, *EGFR, KRAS, NRAS*, PCR Digital, Sequenciamento, *TP53*.

ABSTRACT

Colorectal cancer (CRC) is one of the leading causes of morbidity and mortality worldwide. Detection prior to metastasis and appropriate therapeutic application lead to greater patient survival and quality of life. However, the diagnosis and postoperative surveillance are surrounded by limitations, which contribute to the high computed mortality. The detection of genetic biomarkers and their better applicability in practice are influential factors that contribute to favorable clinical outcomes. To better understand the molecular basis associated with colorectal cancer, we investigated *KRAS, NRAS, BRAF, EGFR* and *TP53* genes in the DNA of tumor and healthy cells using Sanger sequencing. The most frequent alteration, present only in the tumor DNA (somatic), was used to investigate, by Digital PCR (ddPCR), the detection and analysis of circulating tumor DNA (ctDNA) in the plasma. Altogether, 42 subjects made up the study, most of them male (59.5%), with a mean age of 63 years (SD: 10.0; min: 41; max: 83) and tumors located in the right colon (21.4%). transversal (2.4%), left (4.8%), sigmoid (33.3%) and straight (38.1%). Germline and somatic allelic variants were found in the *KRAS*, *EGFR* and *TP53* genes. The most frequent somatic alteration in the study was rs121913529, which showed a statistically significant association with alcohol consumption ($p = 0.002$). Also involving somatic alterations, it was observed that patients with a somatic mutation in *TP53* are ten times more likely to die, compared with the chance of those without a mutation in this tumor suppressor gene (OR 11.2; 95% CI 1.25 - 245). The applicability of these somatic changes in the liquid biopsy technique was demonstrated by the positivity of rs121913529 in plasma ctDNA by ddPCR. Therefore, the results obtained expand the understanding of the molecular basis of CRC and present an optimization of the liquid biopsy technique, timely for clinical practice.

Keywords: Biomarkers, *BRAF*, colorectal cancer, ctDNA, digital PCR, *EGFR, KRAS*, liquid biopsy, *NRAS*, sequencing, *TP53*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática da hipótese de carcinogênese do CCR……... 23
Figura 2 - Estado ativo e inativo da proteína K-RAS...……...…… 24
Figura 3 - Vias do receptor do fator de crescimento epidérmico - *EGFR*……... 26
Figura 4 - Ciclo celular…… 28
Figura 5 - Atuação da proteína P53…...…….. 29
Figura 6 - Análise molecular tecidual…….. 33
Figura 7 - Aplicabilidade na técnica de biópsia líquida……... 38
Figura 8 - Distribuição das variantes alélicas identificadas no estudo……..…….. 43
Figura 9 - Alterações no exon 2 do gene *KRAS*……..…… 44
Figura 10 - Alterações intrônicas identificadas no *EGFR*……... 45
Figura 11 - Alteração exônica identificada no *EGFR*…….. 46
Figura 12 - Alteração no exon 4 do gene *TP53*……... 47
Figura 13 - Alteração no exon 5 do gene *TP53*……... 48
Figura 14 - Alterações no exon 7 do gene *TP53*…….. 49
Figura 15 - Alterações no exon 8 e variante intrônica no gene *TP53*…….. 50
Figura 16 - Análise do tecido tumoral e ctDNA por ddPCR……... 52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Recomendações para a triagem do CCR……. 19
Tabela 2 - Sistema TNM……... 20
Tabela 3 - Estadiamento……... 21
Tabela 4 - Intervenção terapêutica por estágio e localização do tumor…… 22
Tabela 5 - Reação de PCR com *Taq Platinum* e *Gold*…….. 34
Tabela 6 - Especificações dos iniciadores…… 35
Tabela 7 - Reação de sequenciamento…….. 36
Tabela 8 - Perfil clínico dos pacientes…….. 40
Tabela 9 - Alterações germinativas identificadas……. 41
Tabela 10 - Alterações somáticas identificadas…… 42
Tabela 11 - Predição *in silico* das alterações…… 51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABraOM	Arquivo Brasileiro Online de Mutações
AKT	*Serine/threonine-protein kinase AKT*
APC	*Adenomatous polyposis coli*
ATM	*Ataxia-telangiectasia mutated kinase*
ATR	*Ataxia Telangiectasia Mutated and Rad3 Related*
BRAF	*B-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CCR	Câncer colorretal
CEA	Antígeno carcinoembrionário
cfDNA	DNA circulante livre de células
Chk1	*Checkpoint kinase 1*
Chk2	*Checkpoint kinase 2*
Clinvar	*Clinically relevant variation*
ctDNA	DNA tumoral circulante
CTNNB1	*catenin-β1*
ddPCR	PCR Digital
DDR	Resposta de dano ao DNA
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos - dATP, dGTP, dTTP, dCTP
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGFR	*Epidermal growth factor receptor*
ERBB2	*Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 2*
ERBB3	*Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 3*
ERK	*Extracellular signal-regulated kinases*
FAM123B	*Family with sequence similarity 123B*
FIT	Teste imunoquímico fecal
FZD10	*Frizzled class receptor 10;*
GAP	Proteínas ativadoras de GTPase
GDP	Guanosina difosfato
GEF	Fator de troca de nucleotídeos guanina
GTP	Guanosina trifosfato

HRAS	*HRas proto-oncogene, GTPase*
IDH	Índice de Desenvolvimento Humano
INCA	Instituto Nacional de Câncer
kDa	Kilodaltons
KRAS	*KRAS proto-oncogene, GTPase*
L	Litro
LRP5	*Low-density lipoprotein receptor-related protein 5;*
MAF	Frequência do alelo menor
MAPK	*Mitogen-activated protein kinase*
MEK	*Mitogen-activated protein kinase kinase*
mg	Miligrama
µl	Microlitro
ml	Mililitro
mTOR	*Serine/threonine-protein kinase mTOR*
NCBI	*Center for Biotechnology Information*
ng	Nanograma
NIH	*National Institutes of Health*
NRAS	*NRAS proto-oncogene, GTPase*
NSCLC	Câncer de pulmão de células não pequenas
pb	Pares de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial de Hidrogênio
PI3K	*Phosphatidylinositol 3-kinase*
PI3KCA	*Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit-α*
PolyPhen-2	*Polymorphism Phenotyping v2*
PROVEAN	*Protein Variation Effect Analyzer*
PTEN	*Phosphatase and tensin homologue*
RAF	*RAF proto-oncogene serine/threonine-protein kinase*
RAS	*GTPase Ras*
RNA	Ácido Ribonucleico
SFRP	*Secreted frizzled-related protein*
SIFT	*Sorting Tolerant From Intolerant*
SMAD4	*SMAD family member 4*

TC	Tomografia Computadorizada
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGFβ	*TGFβ transforming growth factor beta*
TGFBR2	*TGFβ receptor 2*
TN	Tecido Normal
TT	Tecido Tumoral
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UICC	União Internacional para o Controle do Câncer

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO……16

2 REFERENCIAL TEÓRICO……...18

2.1 Câncer Colorretal (CCR)……... 18

2.1.1 Aspectos epidemiológicos……18

2.1.2 Fatores de risco……... 18

2.1.3 Rastreamento……...19

2.1.4 Manifestações clínicas…… 19

2.1.5 Diagnóstico……..20

2.1.6 Tratamento…….. 21

2.1.7 Monitoramento……22

2.2 Marcadores moleculares no Câncer Colorretal……... 22

2.2.1 KRAS……... 24

2.2.2 NRAS……... 25

2.2.3 EGFR……...25

2.2.4 BRAF……...27

2.2.5 TP53……27

2.3 Biópsia Líquida……... 30

3 OBJETIVOS……31

3.1 Objetivo Geral……31

3.2 Objetivos Específicos…….. 31

4 MÉTODOS……...… 32

4.1 Princípios éticos……...32

4.2 Seleção dos participantes……32

4.3 Dados clínicos…….. 32

4.4 Amostras estudadas…… 32

4.5 Análise molecular tecidual…… 33

4.5.1 Extração de DNA tecidual…….. 33

4.5.2 Quantificação e diluição……34

4.5.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)……... 34

4.5.4 Eletroforese (gel de acrilamida)…… 36
4.5.5 Purificação do produto de PCR……..36
4.5.6 Reação de sequenciamento……36
4.5.7 Precipitação da placa……..37
4.5.8 Análise do sequenciamento……37
4.5.9 Análise Estatística……..……37
4.6 Aplicabilidade das alterações na técnica de Biópsia Líquida……. 38
4.6.1 Separação do plasma……...39
4.6.2 Isolamento do cfDNA……..39
4.6.3 PCR Digital…… 39

5 RESULTADOS…… 40
5.1 Perfil clínico dos pacientes…… 40
5.2 Análise molecular……41
5.2.1 KRAS……... 44
5.2.2 EGFR……...45
5.2.3 TP53……46
5.3 Impacto das alterações sobre a estrutura protéica…….. 50
5.4 Biópsia líquida……52

6 DISCUSSÃO……53

7 CONCLUSÃO…….. 61

REFERÊNCIAS…….. 62

1 INTRODUÇÃO

O câncer de intestino compreende tumores que se originam no cólon e reto, porções finais do intestino grosso. Por isso, também é conhecido como câncer de cólon e reto ou colorretal - CCR (SYMONDS et al., 2018). Compreende um dos principais responsáveis pelas causas de morbidade e mortalidade no mundo (MALLMANN et al., 2017; OLIVEIRA & HIRATA, 2018; CARDOSO et al., 2021), sendo, no Brasil, a segunda neoplasia com maior incidência em mulheres e homens (INCA, 2021).

Tais aspectos epidemiológicos associam-se a um histórico familiar ou pessoal de câncer, presença de pólipos de cólon, doenças inflamatórias intestinais (doença de Crohn e colite ulcerativa), diabetes mellitus e colecistectomias (ZHANG et al., 2017; PANG et al., 2018). Além dessas bases genéticas e clínicas, hábitos de vida, como sedentarismo, excesso de peso corporal, obesidade, tabagismo, etilismo e padrões alimentares inadequados, também são fatores de risco (INCA, 2021; SAWICKI et al., 2021).

De forma majoritária, a detecção prévia à metástase favorece a recuperação e cura do paciente (SCHØLER et al., 2017). Todavia, o diagnóstico de CCR permanece como um fator complicador, pois requer a retirada do tecido tumoral para análise, caracterizando-se como um processo invasivo e dispendioso (OSUMI et al., 2019). Ademais, a vigilância pós-operatória, mediada por exames de imagem e dosagens do nível sérico do antígeno carcinoembrionário (CEA), abarca limitações. A tomografia computadorizada (TC) associa-se a achados inespecíficos e risco de neoplasias malignas secundárias, e, a elevação do CEA ocorre em uma variedade de doenças (OLIVEIRA & HIRATA, 2018).

Os desafios no diagnóstico, em consonância com a dificuldade em monitorar a doença, contribuem para que mais da metade dos pacientes desenvolvam a doença metastática (HERMAN et al., 2013). Nesse estágio da doença, a sobrevida relativa de 5 anos é de 70% para metástases regionais e 13% para metástases distantes. Percentual consideravelmente menor, se comparado a pacientes com doença localizada, com uma sobrevida estimada em 90% (KIDESS-SIGAL et al., 2016).

A biópsia líquida compreende uma técnica capaz de detectar o DNA tumoral circulante (ctDNA), integrado ao DNA livre de células (cfDNA), em fluidos corporais (YAMADA et al., 2018; OSUMI et al., 2019). O ctDNA consiste em fragmentos pequenos de DNA tumoral, com cerca de 70 a 200 pares de base (pb). Esse ácido nucléico é liberado das células tumorais primárias, metastáticas e circulantes submetidas à apoptose ou necrose, e, se propaga juntamente com o DNA de células saudáveis (SAINI et al., 2018).

Sobre todas as dificuldades citadas, a biópsia líquida apresenta vantagens, pois corresponde a um método rápido, com menor risco e custo, que reflete um ctDNA procedente de células oriundas de diferentes regiões do tumor. Atuando, portanto, com potencial para identificar alterações genéticas e epigenéticas que abrangem todo o tumor (BARROS et al., 2018; GERMANO et al., 2018). Ademais, a facilidade em obter amostras não invasivas possibilita a aplicação da técnica antes, durante e após o tratamento, fornecendo informações substanciais sobre as alterações genéticas que ocorrem no transcorrer da doença, viabilizando monitorar a doença residual mínima, a resposta à intervenção terapêutica, e, identificar casos de recidiva ou metástase, anteriormente aos métodos tradicionais (SCHØLER et al., 2017).

Dentro desse contexto, as bases moleculares do CCR apresentam-se como instrumentos para ampliar o entendimento das relações genótipo-fenótipo da doença. A identificação de biomarcadores associados abre caminhos para o desenvolvimento e aplicação de abordagens promissoras e personalizadas, como a técnica de biópsia líquida, com capacidade de maximizar a eficácia e mitigar os riscos. Para tal fim, este estudo avaliou os genes *KRAS* (exon 2-3)*, NRAS* (exons 2-3)*, BRAF* (exon 15)*, EGFR* (exons 18-21) e *TP53* (exons 4-9), em pacientes com o CCR, e a aplicabilidade da alteração somática mais frequente na técnica de biópsia líquida otimizada.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Câncer Colorretal (CCR)

O câncer de intestino compreende tumores - massa anormal de células, que se originam no cólon e reto (OLIVEIRA & NETO, 2015; KUMAR, ABBAS & ASTER, 2016). Por isso, também é conhecido como câncer de cólon e reto ou colorretal - CCR (SYMONDS et al., 2018). A maioria dos cânceres colorretais origina-se do pólipo adenomatoso. Pólipos são crescimentos de tecido extra sobre a parede interna do intestino (SIMON, 2016; PATEL, 2020). Em estágios mais avançados, as células do CCR podem se deslocar por meio da matriz extracelular, invadir a circulação sanguínea ou linfática, e se instalarem em outro órgão - processo identificado como metástase (FILHO, 2021).

2.1.1 Aspectos epidemiológicos

O CCR compreende, globalmente, uma das principais causas de morbidade e mortalidade por câncer (ARNOLD et al., 2017; CARDOSO et al., 2021). A mortalidade por CCR no Brasil ocupa o terceiro lugar e, em termos de incidência, é o segundo tipo de câncer mais frequente nos homens e mulheres, ficando atrás do câncer de próstata para o gênero masculino, e, após o câncer de mama no gênero feminino (INCA, 2021). Cumpre destacar que há uma ampla variação geográfica abarcando as taxas de incidência e mortalidade, com números mais expressivos em países com alto índice de desenvolvimento humano (IDH) e com estilo de vida "ocidental", devido a fatores de risco associados (WONG et al., 2020).

2.1.2 Fatores de risco

Diversos fatores têm sido elencados no processo de carcinogênese colorretal. Alguns fatores associam-se a genética familiar e história clínica, são eles: histórico familiar ou pessoal de câncer, presença de pólipos de cólon, doenças inflamatórias intestinais (doença de Crohn e colite ulcerativa), diabetes mellitus e colecistectomias (ZHANG et al., 2017; PANG et al., 2018; SAWICKI et al., 2021). Outros fatores de risco correspondem aos hábitos de vida, como sedentarismo, excesso de peso corporal, obesidade, tabagismo, etilismo, padrões alimentares inadequados. Em relação à alimentação não saudável, destacam-se as dietas pobres em frutas, vegetais e outros alimentos que contenham fibras, consumo de alimentos processados e a ingestão excessiva de carne vermelha. Ademais, a microbiota intestinal, idade igual ou acima de 50 anos, gênero masculino e condições socioeconômicas também são fatores influentes (INCA, 2021; SAWICKI et al., 2021).

2.1.3 Rastreamento

Considerando os dados epidemiológicos do CCR apontados, o rastreamento, junto à remoção de adenomas de cólon em indivíduos assintomáticos, exibe potencial para reduzir a incidência e mortalidade da doença. A Tabela 1 foi elaborada com base nas informações defendidas por Gupta, Kupfer & Davis (2019).

Tabela 1 - Recomendações para a triagem do CCR

História familiar	**Triagem recomendada**
Risco médio, sem história familiar de alto risco	Início da triagem aos 50 anos. Exceto em pessoas afro-americanas, nas quais a evidência limitada apoia triagem a partir dos 45 anos (recomendação fraca e evidência de qualidade muito baixa).
Histórico familiar de CCR ou adenoma avançado em parente de primeiro grau com menos de 60 anos, ou, 2 parentes de primeiro grau em qualquer idade	Iniciar a colonoscopia 10 anos antes da idade de diagnóstico do parente afetado mais jovem ou aos 40 anos de idade e repetição do exame a cada 5 anos (recomendação fraca; evidência de baixa qualidade).
Único parente de primeiro grau diagnosticado com 60 anos ou mais	Iniciar o rastreio a partir dos 40 anos (recomendação fraca; evidência de qualidade muito baixa).
Exames	**Triagem recomendada**
Testes de primeiro nível	Preferencialmente, colonoscopia a cada 10 anos ou teste imunoquímico fecal (FIT) anual (forte recomendação; evidência de qualidade moderada).
Testes de segundo nível	Colonografia de tomografia computadorizada (TC) a cada 5 anos, teste FIT de DNA fecal a cada 3 anos (forte recomendação; evidência de baixa qualidade) e sigmoidoscopia flexível a cada 5 a 10 anos (forte recomendação; evidência de alta qualidade).
Descontinuação da triagem	75 anos com triagens negativas anteriores ou menos de 10 anos de expectativa de vida (recomendação fraca; evidência de baixa qualidade).

Fonte: Adaptado de GUPTA, N; KUPFER, S, S; DAVIS, A, M. Colorectal Cancer Screening. **JAMA**, v. 321, n. 20, p. 2022-2023. 2019.

2.1.4 Manifestações clínicas

Dentre os sintomas associados ao CCR, os mais frequentes incluem a presença de sangue nas fezes, alteração do hábito intestinal - como diarréia e prisão de ventre alternados, dor ou desconforto abdominal, fraqueza, anemia por deficiência de ferro, inexplicável perda de peso, alteração na forma das fezes e tumoração abdominal. Ademais, sintomas não específicos do local também são elencados, como a trombose venosa profunda (INCA, 2021).

2.1.5 Diagnóstico

Indivíduos com suspeita de CCR realizam, a princípio, o exame físico do abdômen e análise do histórico de saúde, seguido de exames comprobatórios (SAWICKI et al., 2021). O diagnóstico é efetivado a partir do exame histopatológico de espécime tumoral, obtido por meio do exame de colonoscopia ou da peça cirúrgica. Uma segunda possibilidade para diagnóstico é o exame radiológico contrastado do cólon - recomendado para pacientes com contraindicação médica ou sem acesso à colonoscopia. Exames de imagem, como ultrassom, tomografia computadorizada e ressonância magnética são elencados com aplicabilidade na detecção de metástases intra-abdominais e pélvicas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

2.1.5.1 Estadiamento

O estadiamento sintetiza informações associadas à doença e espelha informações que se associam à sobrevida do paciente. Dentre os sistemas de estadiamento, o mais utilizado é o TNM de Classificação dos Tumores Malignos, preconizado pela União Internacional para o Controle do Câncer (UICC). As variáveis consideradas nesse sistema envolvem a extensão anatômica da doença e as características do tumor primário (T), as características dos linfonodos que drenam o órgão em que o tumor se localiza (N) e informações de metástases a distância (M), conforme expresso na Tabela 2 (INCA, 2021).

Tabela 2 - Sistema TNM

Sistema TNM	
Tx	Tumor não avaliável
T0	Sem evidência de tumor
Tis	Tumor *in situ*
T1	Infiltra a submucosa
T2	Infiltra a muscular própria
T3	Invade a subserosa
T4	Invade outros órgãos ou estruturas
Nx	Linfonodos regionais não avaliáveis
N0	Sem metástases para linfonodos
N1	Metástase em 1-3 linfonodos
N2	Metástase em 4 linfonodos ou mais
Mx	Sem pesquisa de metástases à distância
M0	Sem metástases à distância
M1	Metástases à distância

Fonte: Adaptado da Sociedade Brasileira de Cancerologia (2011).

As categorias T, N e M agrupam-se em estádios que variam de I a IV. Essas combinações, a fim de expressar o nível de evolução da doença, subdividem-se em níveis A, B e C. O sistema de Dukes (modificado por Astler-Coller) é mais antigo e apresenta concordância com o sistema TNM (NETO et al., 2006; ROCHA, 2011). A classificação em estádios e o sistema DUKES encontram-se explícitos na Tabela 3.

Tabela 3 - Estadiamento

Estádio	T	N	M	DUKES
I	T1/2	N0	M0	A
IIA	T3	N0	M0	B
IIB	T4	N0	M0	
IIIA	T1/2	N1	M0	C
IIIB	T3/4	N1	M0	
IIIC	Qualquer T	N2	M0	
IV	Qualquer T	Qualquer N	M1	D

Fonte: Adaptado da Sociedade Brasileira de Cancerologia (2011).

O estadiamento patológico, realizado a partir do exame anatomopatológico da peça cirúrgica, é o mais completo. Cumpre salientar que o estadiamento corretamente realizado conduz para a aplicação correta de abordagens terapêuticas específicas (INCA, 2021).

2.1.6 Tratamento

Uma vez que o diagnóstico é estabelecido, intervenções terapêuticas são necessárias. A depender das especificações do caso, como a presença ou ausência de biomarcadores genéticos, a quimioterapia e a radioterapia podem ser indicadas como forma de tratamento (SAWICKI et al., 2021). O tratamento padrão para o CCR abrange a ressecção cirúrgica. A cirurgia tem aplicabilidade para pacientes em estágio inicial ou avançado. Apresenta caráter curativo, quando promove completa remoção do tumor primário e outras estruturas acometidas por metástase. Em pacientes sem condições de cura por ressecção, a cirurgia atua de forma paliativa, a fim de minimizar os sintomas e melhorar a qualidade de vida (PLUMMER et al., 2016). As recomendações de tratamento variam a depender do estadiamento, conforme sintetizado na Tabela 4.

Tabela 4 - Intervenção terapêutica por estágio e localização do tumor

Estádio	Recomendações de tratamento para CA de cólon e reto alto	Recomendações de tratamento para CA de reto médio e baixo
I	Cirurgia colonoscópica, aberta ou Colectomia laparoscópica.	Ressecção transanal, cirurgia aberta ou cirurgia laparoscópica.
II	Cirurgia aberta ou Colectomia laparoscópica. Pode haver associação com quimioterapia pós-operatória.	Tratamento pré-operatório (neoadjuvante): radioterapia e quimioterapia, a depender do estado geral do paciente. Cirurgia aberta ou laparoscópica. Pode haver necessidade de complementação com quimioterapia pós-operatória.
III	Cirurgia aberta ou Colectomia laparoscópica, com quimioterapia pós-operatória adjuvante.	
IV	Quimioterapia paliativa, associada ou não a drogas de alvo-molecular. Cirurgia ou a Radiofrequência, em casos de metástases localizadas no fígado ou pulmão.	Quimioterapia paliativa, associada ou não a drogas de alvo-molecular. Radioterapia externa. Cirurgia para remoção do tumor de reto e para a remoção de metástases.

Fonte: Adaptado do Instituto Vencer o Câncer (2021).

2.1.7 Monitoramento

Após o tratamento, o monitoramento é de extrema relevância para o diagnóstico precoce de recidiva ou novos tumores (INCA, 2021). As recomendações abrangem consultas com periodicidade de 3 a 6 meses nos primeiros três anos após o tratamento e a cada 6 meses até o quinto ano, dosagem sérica do antígeno carcinoembrionário (CEA) e exames de imagem, como a tomografia computadorizada e a colonoscopia. Referente à tomografia, sugere-se que seja anual nos primeiros três anos, e, em relação à colonoscopia, realização após um ano da cirurgia. Colonoscopia com resultado normal é repetida em intervalos de 5 anos; com alterações, em intervalos anuais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

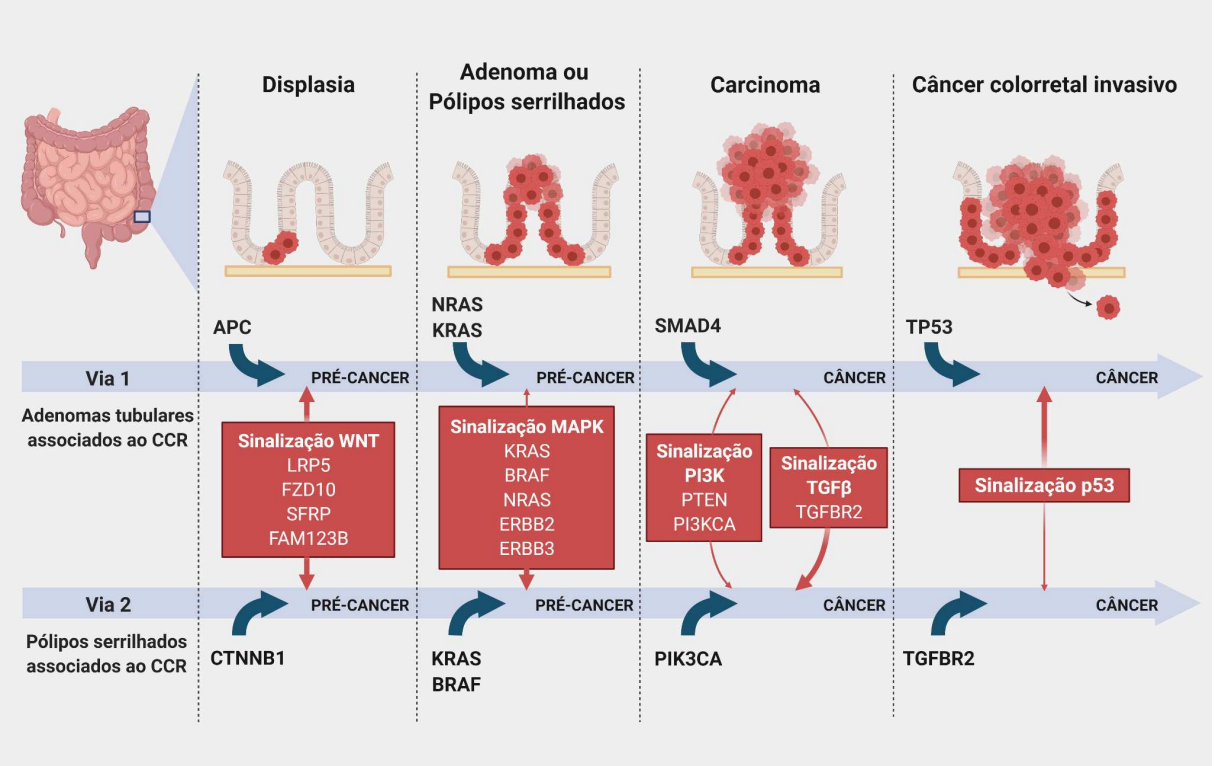
2.2 Marcadores moleculares no Câncer Colorretal

Diferentes marcadores moleculares têm aplicabilidade desde o rastreamento da população até o monitoramento. As alterações identificadas podem ser classificadas como germinativas ou somáticas (FILIPSKI et al., 2014). As germinativas acontecem em células reprodutivas (óvulo ou espermatozóide) e são passadas para a próxima geração, afetando todas as células do indivíduo. As somáticas decorrem de modificações em células não reprodutivas e não são herdadas (NIH, 2021). Essas variantes, sejam elas germinativas ou somáticas, podem ter relação com o surgimento do CCR (ARCHAMBAULT et al., 2020).

O processo de carcinogênese inicia-se com alterações primárias e, com a multiplicação celular, surgem células filhas com alterações genéticas e alterações secundárias. Esse acúmulo de alterações culminam no surgimento do tumor. Insta-se que os tumores colorretais surgem como resultado da ativação mutacional de oncogenes (proto-oncogenes alterados) com a inativação mutacional de genes supressores de tumor (PARREIRAS et al., 2013).

Há duas vias envolvidas na progressão do pólipo ao CCR - Figura 1. A via clássica, iniciada por adenomas tubulares, e, a via alternativa, que surge a partir de pólipos serrilhados. Na Figura 1, os genes alterados epigeneticamente são indicados em cada sequência. Alguns genes são compartilhados entre as duas vias, como *KRAS*. Outros, aparecem só em uma delas, como é o caso do *BRAF*, presente apenas na via serrilhada. Várias vias de sinalização intracelular são desreguladas nesse processo, como a via WNT, MAPK, PI3K, TGFβ e P53. As vias de sinalização intracelular envolvidas na formação do tumor encontram-se evidenciadas na figura (KUIPERS et al., 2015).

Figura 1 - Representação esquemática da hipótese de carcinogênese do CCR



Legenda: A progressão do pólipo à formação do CCR é vista da esquerda para a direita na imagem (setas), e pode ocorrer por duas vias. A via 1 é o caminho clássico e envolve o surgimento do CCR, a partir de adenomas tubulares. A via 2 é considerada alternativa, e se inicia com pólipos serrilhados. As vias de sinalização intracelular envolvidas na formação do tumor encontram-se nos quadrantes em vermelho. A espessura da seta que sai do quadrante reflete o envolvimento da via no câncer.
Fonte: Adaptado de KUIPERS, E. J. et al. Colorectal cancer. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 1, nov. 2015.

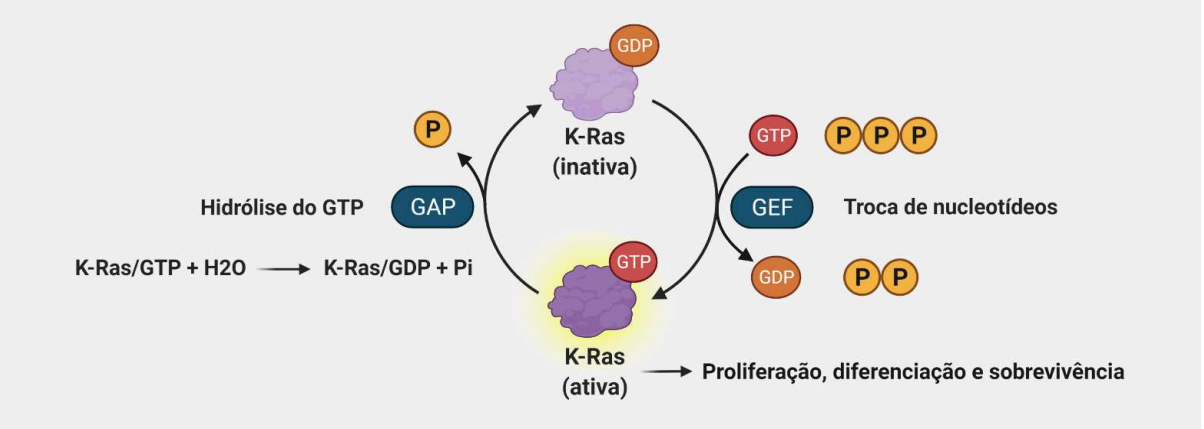
Dentre os genes envolvidos na progressão do CCR, destacam-se *KRAS, NRAS, BRAF* e *TP53*. *APC* e *SMAD4* são inespecíficos, por serem comuns entre todos os subgrupos moleculares (KUIPERS et al., 2015). Quando o câncer se estabelece, *TP53* demonstra grande influência, principalmente nos aspectos de invasão e dispersão do tumor (LI et al., 2019; OLSZEWSKI et al., 2019). Vale ressaltar que associado a via RAS e RAF, está o gene *EGFR*, também listado como influente na carcinogênese do CCR (GLAYSHER et al., 2014; WEE & WANG, 2017; YU & GARCIA, 2020; CHENG et al., 2021).

2.2.1 KRAS

KRAS é um proto-oncogene da família RAS, juntamente com os genes *NRAS* e *HRAS*. Localizado no braço curto cromossomo 12, na região 1, banda 2, sub-banda 1 (12p12.1), *KRAS* é composto por 6 exons, que codificam a proteína K-RAS, integrante da superfamília GTPase. Essa biomolécula apresenta um peso aproximado de 21 kDa e também pode ser identificada como P21 (GENE, 2021).

Proteínas P21 são produzidas na forma precursora citoplasmática e encontram-se ancoradas à superfície interna da membrana plasmática por lipídeos. Atuam na proliferação e diferenciação celular, por meio da transdução de sinais da membrana plasmática ao núcleo (BOQUETT & FERREIRA, 2010). Exibe dois estados diferentes (Figura 2): ligada à GDP (inativa) e GTP (ativa); sendo esta última capaz de mediar resposta à proliferação, diferenciação e sobrevivência (VATANSEVER, ERMAN & GÜMÜŞ, 2019).

Figura 2 - Estado ativo e inativo da proteína K-RAS



Legenda: K-RAS assume a forma inativa, quando combinada com GDP, e, ativa, se estiver conectada com GTP. Fatores de troca de nucleotídeos guanina (GEF) convertem a proteína ao seu estado ativo. Enquanto que o estado inativo é retomado quando proteínas ativadoras de GTPase (GAP) estimulam a hidrólise de GTP.
Fonte: Customizado pelo autor, com o BioRender (2021).

Esse proto-oncogene, quando alterado, é denominado oncogene. A nível celular, há mudanças no fenótipo com apenas um único alelo alterado, o que permite considerar esse oncogene como dominante. Dentre todos os genes da família RAS, *KRAS* é o mais estudado por apresentar mutações mais frequentes, estar associado a tumores mais agressivos e consequente menor sobrevida aos pacientes (BOQUETT & FERREIRA, 2010).

Alterações em *KRAS* são descritas em várias doenças, incluindo o CCR. Nessa neoplasia maligna, as mutações em *KRAS* demarcam uma das alterações iniciais principais que ocorrem na sequência adenoma-carcinoma. Dentro do gene *KRAS*, o exon 2 (códons 12 e 13) e o exon 3 (códon 61) correspondem às regiões mais avaliadas (VATANSEVER, ERMAN & GÜMÜŞ, 2019). Mutações nesses três códons (12, 13 e 61) são descritas com capacidade de comprometer a capacidade de hidrólise e inativação (LU et al., 2016). Assim, a proteína K-RAS em sua forma alterada (oncogênica) promove uma sinalização prolongada e desequilibrada da membrana ao núcleo, contribuindo para formação de um fenótipo neoplásico maligno (BOQUETT & FERREIRA, 2010).

2.2.2 NRAS

NRAS, proto-oncogene também pertencente à família RAS, encontra-se no braço curto do cromossomo 1, na região 1, banda 3, sub-banda 2 (1p13.2). É constituído por 7 exons e origina uma proteína de membrana com atividade GTPase, que se desloca entre o aparelho de Golgi e a membrana plasmática. Assim como no gene *KRAS*, alterações em *NRAS* também foram associadas ao CCR (GENE, 2022). Convém destacar que a super ativação da via RAS pode ser consequência de alterações envolvendo o *EGFR*, devido à convergência existente entre a via RAS e o *EGFR* (WEE & WANG, 2017).

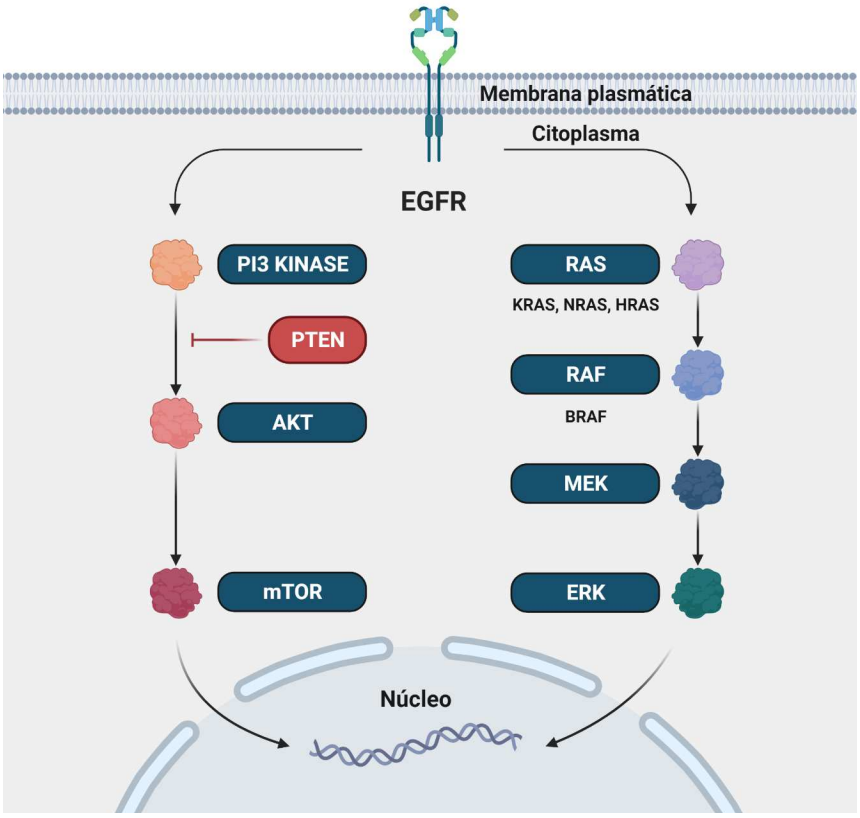
2.2.3 EGFR

EGFR é o gene do receptor do fator de crescimento epidérmico (do inglês "*epidermal growth factor receptor*"), encontra-se localizado no braço curto do cromossomo 7, na região 1, banda 1, sub-banda 2 (7p11.2). Este gene codifica uma glicoproteína transmembrana com atividade quinase, ou seja, com capacidade de modificar outras proteínas adicionando quimicamente grupos fosfato - fosforilação. Esse receptor, ao se ligar no fator de crescimento epidérmico, induz a dimerização do receptor e a autofosforilação da tirosina, levando à proliferação celular (RAEVSKIY et al., 2021; GENE, 2022; MESSEHA et al., 2022).

Dentre os 31 exons que compõem o gene *EGFR*, as mutações já caracterizadas se distribuem, majoritariamente, entre os exons 18-21, responsáveis pela codificação do domínio da tirosina quinase (SHARMA et al., 2007). Alterações nessa porção do gene podem resultar na ativação desregulada da proteína. Esse tipo de mutação ativadora pode ser encontrada em NSCLC (câncer de pulmão de células não pequenas), carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, sistema nervoso central (glioblastoma), pâncreas, ovário e, inclusive, no CCR (WIEDUWILT & MOASSER, 2011; CHENG et al., 2021).

Uma maneira de impedir o crescimento das células cancerosas é por meio do bloqueio do *EGFR*. Todavia, mutações de ativação de efetores de *EGFR* nos genes *KRAS* e *BRAF*, por exemplo, causam ativação persistente da sinalização a jusante, apesar da inibição de *EGFR* (LETO & TRUSOLINO, 2014; LEAL et al., 2019). A associação das vias do *EGFR*, *KRAS*, *BRAF* e outras proteínas relacionadas, encontra-se explícita na Figura 3.

Figura 3 - Vias do receptor do fator de crescimento epidérmico - *EGFR*



Legenda: O fator de crescimento, ao se ligar no receptor, promove a sua dimerização e fosforilação dos domínios intracelulares. O *receptor* ativado leva à ativação das proteínas RAS, que por sua vez ativa RAF e as proteínas quinases MEK e ERK/MAPK, resultando, por fim, na expressão de genes promotores de crescimento. Outra via que abarca o mesmo resultado envolve a ativação do PIK3CA, AKT e mTOR. Nessa via, PTEN atua como antagonista da atividade de PIK3CA.
Fonte: Customizado pelo autor, com o BioRender (2021).

As vias RAS-RAF-MEK-ERK e PI3KINASE-PTEN-AKT-mTOR são complexas e desempenham funções importantes no crescimento de células normais e malignas. Desse modo, alterações genéticas que desregulam essas vias podem causar proliferação celular irrestrita e aumento da sobrevivência celular. Do ponto de vista terapêutico, essas vias são alvos essenciais associadas ao câncer (GLAYSHER et al., 2014; YU & GARCIA, 2020).

2.2.4 BRAF

BRAF, assim como *KRAS*, é um proto-oncogene. Ele está localizado no braço longo do cromossomo 7, na região 3, banda 4 (7q34) e apresenta 23 exons. A proteína codificada por esse gene pertence à família RAF de proteína quinase específica de serina/treonina. Trata-se, portanto, de uma enzima quinase que transfere fosfatos para o grupo OH da serina ou treonina (GENE, 2022). Essa molécula integra e atua na regulação da via do receptor do fator de crescimento - *EGFR*, influente na divisão, diferenciação e secreção celular.

Dentro desse contexto, esse proto-oncogene, quando mutado, é favorável ao processo de carcinogênese. Dentre as alterações descritas nesse gene, a mais comum é a V600E, que corresponde a substituição de uma valina por um ácido glutâmico no códon 600 do exon 15. A valina é necessária para a manutenção do estado inativo do *BRAF*. Quando ocorre a substituição pelo ácido glutâmico, há um aumento de 130 a 700 vezes na atividade da quinase *BRAF*; explicitando sua relação com o câncer (JONES et al., 2017).

Essa troca da valina pelo ácido glutâmico, no códon 600, é frequentemente identificada no CCR e também em outros tipos de câncer, como melanoma, linfoma não Hodgkin, leucemia de células pilosas, carcinoma de tireoide, NSCLC (câncer de pulmão de células não pequenas) e adenocarcinoma de pulmão. Dados sugerem que pacientes com essa alteração não respondem à terapia anti-EGFR, com impacto negativo abrangendo o tempo de sobrevida (CAFIERO et al., 2020).

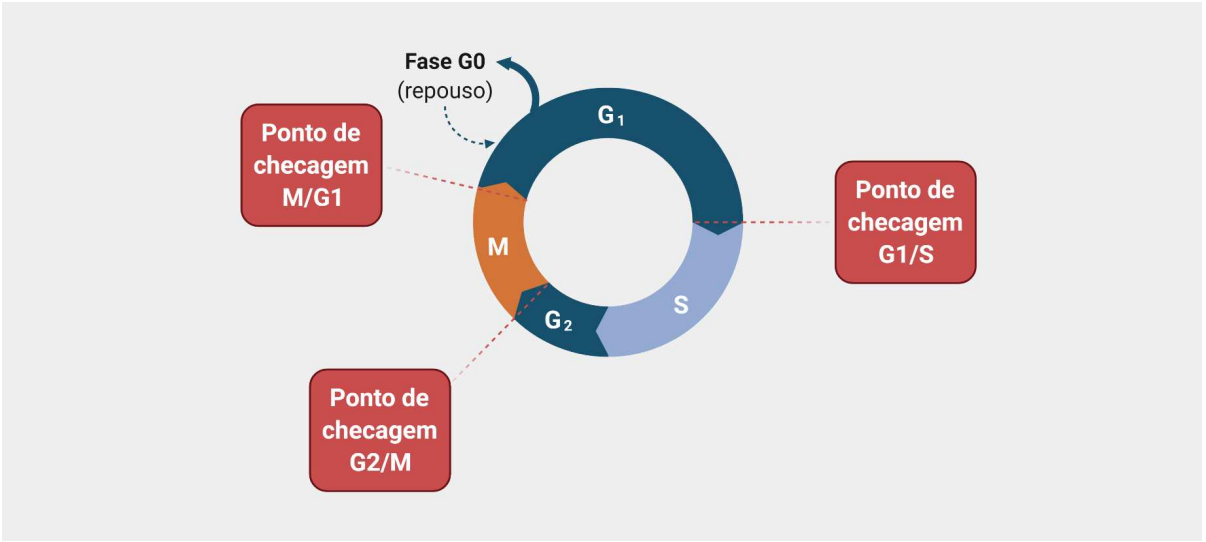
2.2.5 TP53

TP53 é um gene supressor de tumor que atua bloqueando a proliferação celular. Encontra-se localizado no braço curto do cromossomo 17, na região 1, banda 3, sub-banda 1 (17p13.1). A proteína supressora de tumor codificada por esse gene contém domínios de ativação transcricional, ligação ao DNA e oligomerização. Atua em diversas condições, regulando a expressão de genes alvo, para induzir a parada do ciclo celular, apoptose, senescência, reparo de DNA e alterações no metabolismo (GENE, 2022).

Para compreender a ação da proteína P53 e a sua relação com o câncer faz-se necessário entender a respeito do ciclo celular - Figura 4. A vida celular é cíclica, abrangendo várias fases para a duplicação. Essas etapas acomodam-se ao longo da divisão celular (M) ou quando a célula não está se dividindo (intérfase). O momento da intérfase é marcado por preparatórios para a reprodução celular. Nesse estágio, a célula se aperfeiçoa para o processo de síntese (G1), duplica o seu material genético (S) e prepara o seu núcleo para a divisão (G2), que pode ocorrer via mitose ou meiose. Outras vezes, entra em uma fase de repouso, denominada G0 (LIU et al., 2019).

O ciclo celular é permeado por vários processos de regulação - Figura 4, a fim de verificar sinais internos e externos que possam causar intercorrências no processo de divisão celular. Essa regulação ocorre em células normais, garantindo a não divisão de células com DNA danificado, ou mesmo, em locais sem disponibilidade de espaço. Os pontos de checagem ocorrem ao final da fase G1, G2, e M (BERTOLI, SKOTHEIM & BRUIN, 2015).

Figura 4 - Ciclo celular

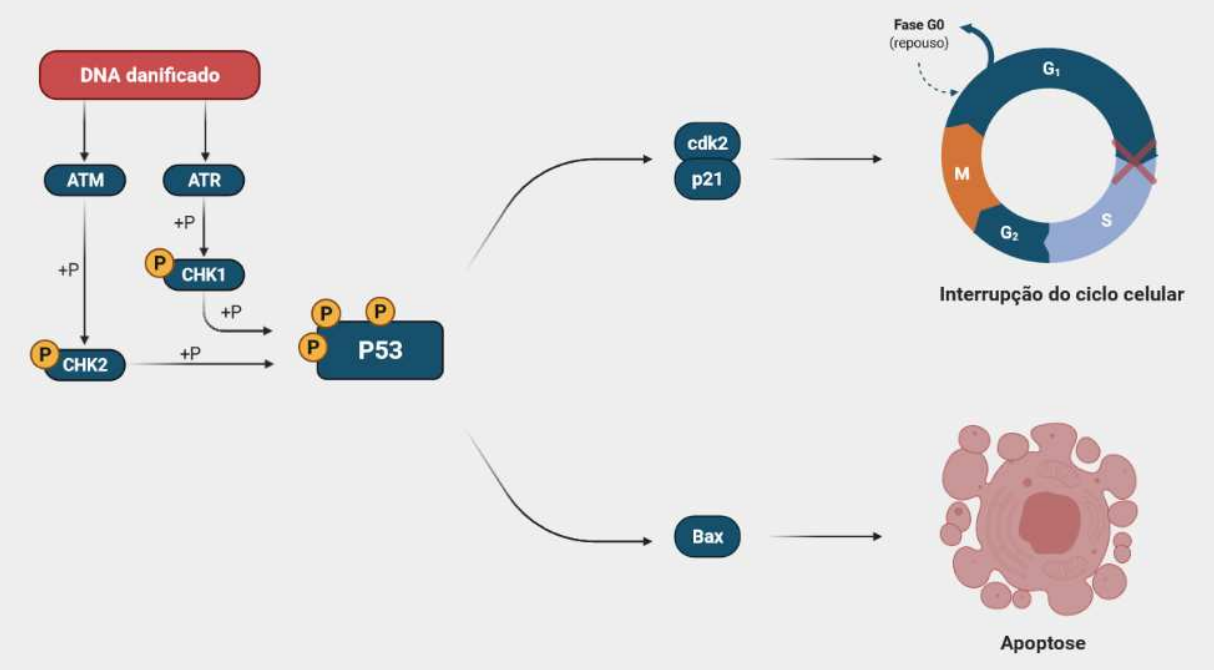


Legenda: Fases do ciclo celular e os pontos de checagem.
Fonte: Customizado pelo autor, com o BioRender (2021).

A nível celular, quando o material genético é modificado, inicia-se uma rede molecular sofisticada envolvida na resposta de dano ao DNA (DDR), com capacidade de corrigir danos no DNA ou eliminar células cujos danos superam as capacidades de reparo (BENEDETTO et al., 2017). Duas vias principais para iniciar DDR são ATM (*Ataxia-telangiectasia mutated kinase*) com ativação da Chk2 - Checkpoint kinase 2, e, ATR (*Ataxia-telangiectasia mutated and Rad3 related*) com ativação da Chk1 - Checkpoint kinase 1 (MEI et al., 2019).

Em resposta às quebras de fita dupla de DNA, as vias ATM-CHK2 e ATR-CHK1 são ativadas e estabilizam P53 por meio de fosforilação. P53 ativa a produção da proteína P21, reguladora da passagem da fase G1 para S no ciclo celular. A proteína P21 complexada ao receptor de ciclina dependente de quinases 2 (cdk2) impede a continuidade da divisão celular, por meio da interrupção do ciclo celular. A fosforilação de P53 também pode resultar na regulação positiva da proteína pró-apoptótica Bax (KELLEY & FISHEL, 2016). A atuação da P53 encontra-se ilustrada na Figura 5.

Figura 5 - Atuação da proteína P53



Legenda: Fosforilação da proteína P53 e sua atuação na interrupção do ciclo celular, por meio do complexo P21-cdk2 e na apoptose, por regulação positiva da proteína pró-apoptótica Bax.
Fonte: Customizado pelo autor, com o BioRender (2021).

A concentração e atividades da P53 são mantidas sob rígido controle, por se tratar de uma molécula com potencial impacto de transformação (LIMA et al., 2006). Alterações envolvendo a proteína P53 geram efeitos anti-apoptóticos, contribuindo para a sobrevivência das células cancerosas. Isso ocorre, pois P53 deixa de ativar a produção de P21, tornando a divisão celular um processo descontrolado, podendo desencadear a formação de tumores. Ao todo, TP53 abrange 12 exons, dentre eles, os exons 5 a 8 são os que sofrem maior número de mutações que se relacionam à tumorigênese. Mutações nesse gene, em geral, compatibilizam com o aparecimento de carcinoma de cólon, sendo mais aparente em tumores biologicamente mais agressivos e com perda da diferenciação celular (RIBEIRO & RIBEIRO, 2006).

2.3 Biópsia Líquida

A biópsia líquida compreende uma técnica capaz de detectar o DNA tumoral circulante (ctDNA), integrado ao DNA livre de células (cfDNA), em fluidos corporais (YAMADA et al., 2019; OSUMI et al., 2019). O ctDNA consiste em fragmentos pequenos de DNA tumoral, com cerca de 70 a 200 pares de base (pb). Esse ácido nucléico é liberado das células tumorais primárias, metastáticas e circulantes submetidas à apoptose ou necrose, e, se propaga no soro, urina ou outro fluido corporal de forma livre, juntamente com o DNA de células saudáveis. O tempo de circulação varia de 15 minutos a 2,5 horas, pois o ctDNA é rapidamente captado e processado pelo fígado e rins (SAINI et al., 2018).

A biópsia tecidual, estabelecida como padrão-ouro, é circundada por inúmeros desafios (QIN et al., 2016; GERMANO et al., 2018; NORMANNO et al., 2018). O procedimento é dispendioso, invasivo e por vezes inacessível, a depender do tamanho e localidade do tumor. Outro fator complicador corresponde à capacidade de modificação das células que compõem o tumor. Desse modo, considerando a heterogeneidade tumoral, a biópsia tradicional expressa informações limitadas do perfil molecular (SCHØLER et al., 2017; LU & LI, 2017; OSUMI et al., 2019).

Para a obtenção de informações mais completas, e atualizadas, requer-se o acesso a consecutivas amostragens. Contudo, esse processo é inaplicável à biópsia tecidual, devido às dificuldades do procedimento e morbidade potencial associada. Complexificando, assim, o monitoramento da doença e a implantação de estratégias terapêuticas eficazes (QIN et al., 2016; LU & LI, 2017). A biópsia líquida apresenta vantagens sobre todas as dificuldades citadas, pois abrange um método rápido, com menor risco e custo em relação à biópsia tradicional, que reflete um ctDNA procedente de células oriundas de diferentes regiões do tecido tumoral. Atuando, portanto, com potencial para identificar alterações genéticas e epigenéticas que abrangem todo o tumor (BARROS et al., 2018; GERMANO et al., 2018).

A detecção de variantes alélicas em genes alvos em ctDNA representa um instrumento promissor para o rastreamento, diagnóstico, prognóstico, monitoramento da progressão do câncer e efeito terapêutico. Contudo, os processos para a obtenção e implementação do ctDNA no CCR requerem cuidados aprofundados com a padronização (WAN et al., 2017; JACOBSON et al., 2019). A fase pré-analítica e a analítica são circundadas por desafios que abrangem desde o correto manuseio e acondicionamento, até a implementação de métodos mais sensíveis e específicos para a captação do ctDNA (SYMONDS et al., 2018; SHARIATPANAHI et al., 2018).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar alterações moleculares nos genes *KRAS, NRAS, BRAF, EGFR* e *TP53,* em amostras de pacientes com Câncer Colorretal (CCR) e aplicabilidade na técnica de biópsia líquida.

3.2 Objetivos Específicos

a) Investigar, por meio de sequenciamento, polimorfismos e/ou mutações nos genes *KRAS* (exons 2-3), *NRAS* (exons 2-3), *BRAF* (exon 15), *EGFR* (exons 18-21) e *TP53* (exons 4-9);

b) Avaliar a relação entre a caracterização molecular e os dados clínicos;

c) Estimar a frequência absoluta e relativa de polimorfismos e/ou mutações nos genes *KRAS* (exons 2-3), *NRAS* (exons 2-3), *BRAF* (exon 15), *EGFR* (exons 18-21) e *TP53* (exons 4-9);

d) Aplicar a alteração somática de maior frequência à técnica de biópsia líquida otimizada.

4 MÉTODOS

4.1 Princípios éticos

O projeto foi aprovado pelo comitê de ética da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), sob o número 09135912.6.0000.5149 do Certificado de Apresentação para Apreciação Ética - CAAE.

4.2 Seleção dos participantes

Pacientes diagnosticados com CCR pela equipe de coloproctologia do Hospital das Clínicas de Belo Horizonte (HC-UFMG) foram convidados a integrar o estudo. Os voluntários foram informados sobre o propósito da pesquisa e a participação efetivou-se por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Considerou-se a idade entre 18 e 85 anos e a previsão para ressecção cirúrgica como critérios para inclusão na pesquisa. Os critérios de exclusão são complementares aos de inclusão.

4.3 Dados clínicos

Dados clínicos dos pacientes foram registrados na planilha da pesquisa, a partir da análise do prontuário eletrônico do sistema SOUL MV do HC-UFMG, e também por meio da análise de prontuários físicos no Sistema de Arquivo Médico e Estatístico (SAME). Para acesso a esses dados, além da autorização comprovada pela assinatura dos pacientes no TCLE, o projeto foi aprovado pela Gerência de Ensino e Pesquisa (GEP) do HC-UFMG.

Os pacientes foram acompanhados ao longo do período de 23 meses de realização prática do estudo. Informações associadas ao tratamento de adjuvância, como duração, fármacos utilizados e intercorrências foram registradas. Além disso, o desfecho apresentado pelo paciente na última data de avaliação de acompanhamento, em relação à presença ou ausência do óbito, foi armazenado no banco de dados da pesquisa.

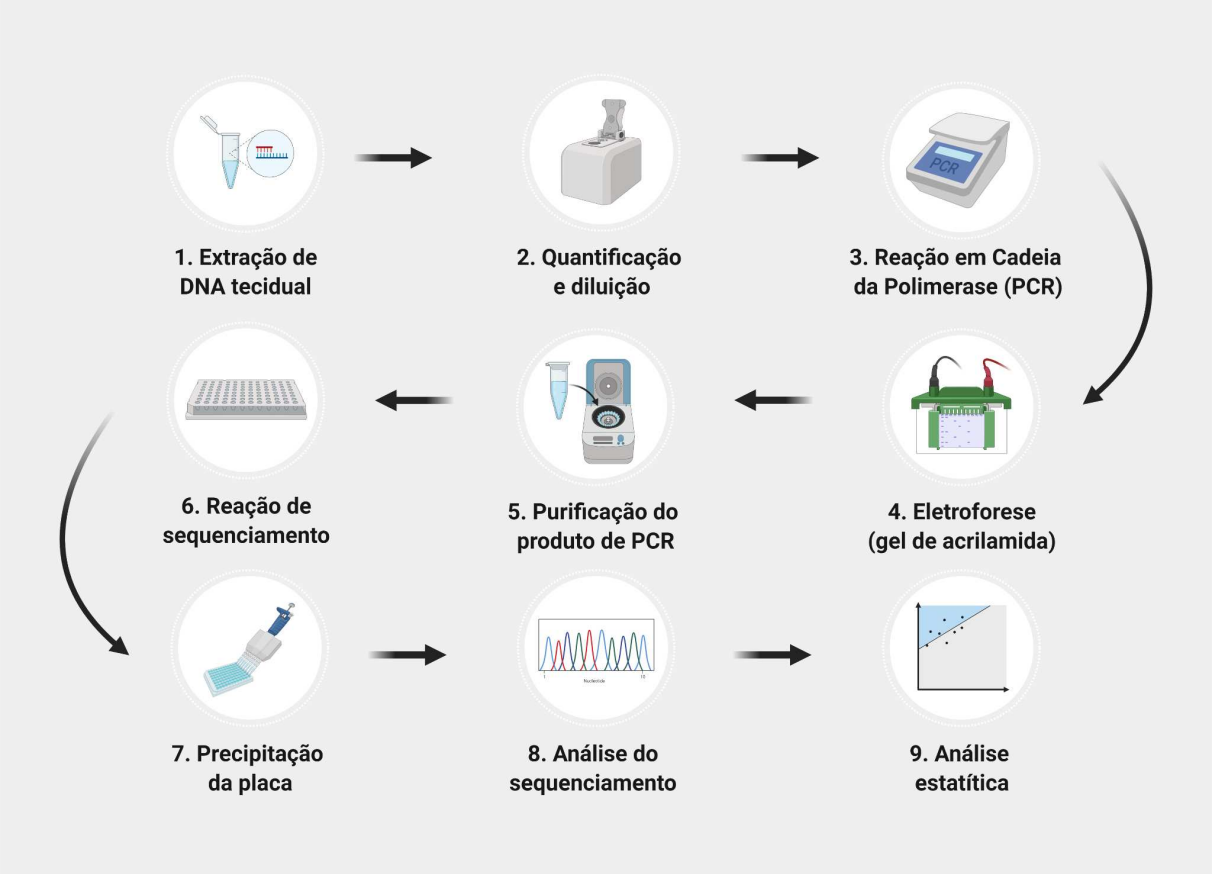
4.4 Amostras estudadas

Para o estudo, fragmentos do tecido tumoral (TT) e normal (TN) foram coletados pela equipe cirúrgica de coloproctologia. Os tecidos, logo que coletados, foram acondicionados em eppendorf de 1,5 mL, estéreis, previamente preenchidos com 1,0 mL da solução de RNAlater®, eficaz para preservar a histologia dos tecidos (ThermoFisher); com posterior armazenamento a - 80 ºC. Além dos tecidos, uma amostra de aproximadamente 4 mL de sangue total periférico foi obtida em tubo EDTA, antes do procedimento de ressecção.

4.5 Análise molecular tecidual

A investigação das bases moleculares associadas ao câncer de intestino encontra-se exposta na Figura 6. As etapas envolvidas estão detalhadas nos subitens a seguir.

Figura 6 - Análise molecular tecidual



Legenda: Fluxograma ilustrando o delineamento do estudo voltado para a análise molecular dos tecidos.
Fonte: Customizado pelo autor, com o BioRender (2021).

4.5.1 Extração de DNA tecidual

A extração do DNA tecidual foi realizada com proteinase K, conforme metodologia desenvolvida por Miller, Dykes e Polesky (1988). Cada amostra de tecido foi acondicionada em um eppendorf de 1,5 mL, previamente preenchido com 200 µL de tampão de lise (Tris-HCl 1 M, pH 8,0; SDS 10%, EDTA 0,5 M, pH 8,0; H_2O) e 16,36 µL de proteinase K (20 mg/mL). Posteriormente, foram mantidas em banho-maria a 65 ºC, durante 1 hora.

Após esse período, mais 200 µL de tampão de lise foram adicionados, as amostras foram mantidas a temperatura ambiente por 15 minutos e centrifugadas por 20 minutos a 11.000 g. O sobrenadante foi coletado e transferido para tubo de rosca de 1,5 mL. Adicionou-se a ele, o dobro de etanol 100% e 10% do volume do sobrenadante de acetato de

sódio (3M, pH 8,2). O DNA precipitado foi lavado em etanol 70% e, após a secagem, eluído em 200 µL de TE (Tris-HCl 1 M; EDTA 0,5 M, pH 8,0).

4.5.2 Quantificação e diluição

Após a extração do DNA, fez-se a quantificação, para averiguar a quantidade de DNA extraída na etapa descrita anteriormente. Para essa quantificação, utilizou-se o espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). A pureza das amostras foi dada por meio das razões 260/280 e 260/230. A partir dessa etapa, as amostras foram diluídas para uma concentração de 25 ng/µL e armazenadas em geladeira de DNA específica, a 4 ºC.

4.5.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A partir do processo de extração tem-se todo o conteúdo genético celular. Entretanto, para a avaliação de regiões específicas, associadas à tumorigênese do CCR, fez-se a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), em fluxo laminar. Por meio dessa técnica é possível obter milhões de cópias da região de interesse. A reação de PCR diferenciou-se com base na enzima Taq DNA Polimerase utilizada, conforme descrição da Tabela 5.

Tabela 5 - Reação de PCR com Taq *Platinum* e *Gold*

Enzima	Reagente	Quantidade (1 amostra)	Ciclagem no termociclador
Taq *Platinum*	H_2O	13,6 µL	Passo 1: 95 ºC, por 10 minutos. Passo 2: 95 ºC, por 1 minuto. Passo 3: temperatura de anelamento específica do primer, por 1 minuto. Passo 4: 72 ºC, por 1 minuto. Passo 5: retornar no passo 2, 34 vezes. Passo 6: 72 ºC, por 10 minutos. Passo 7: 4 ºC, por 20 minutos.
	Tampão	2,5 µL	
	dNTP	2,5 µL	
	$MgCl_2$	1,0 µL	
	Primer F	0,5 µL	
	Primer R	0,5 µL	
	Taq	0,4 µL	
	DNA molde	4,0 µL	
Taq *Gold*	H_2O	2,75 µL	Passo 1: 95 ºC, por 10 minutos. Passo 2: 95 ºC, por 30 segundos. Passo 3: temperatura de anelamento específica do primer, por 30 segundos. Passo 4: 72 ºC, por 1 minuto. Passo 5: retornar no passo 2, 34 vezes. Passo 6: 72 ºC, por 7 minutos. Passo 7: 4 ºC, por 20 minutos.
	Primer F	0,5 µL	
	Primer R	0,5 µL	
	Taq	6,25 µL	
	DNA molde	4,0 µL	

Legenda: O protocolo para cada PCR variou conforme a enzima utilizada. Observa-se que o volume final difere para cada reação (25,0 µL para PCR com Taq *Platinum* e 14,0 µL com Taq *Gold*). Ademais, na reação com Taq *Gold*, menos elementos são adicionados, pois o frasco com a enzima vem acompanhado de outros reagentes.
Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

A ciclagem no termociclador foi diferente para o gene *KRAS*, visto que, com o intuito de aumentar a sensibilidade na detecção da mutação, seguiu-se a programação COLD-PCR, descrita por Zuo (2009). Os iniciadores (Tabela 6) utilizados para a amplificação dos exons *KRAS, NRAS, BRAF, EGFR* e *TP53* foram desenhados com base nas informações contidas no banco de dados genéticos denominado Ensembl, e, utilizando o programa Primer3 v.4.0.

Tabela 6 - Especificações dos iniciadores

Gene	Exon(s)	Primer	Sequência	Tamanho	Ta
KRAS	2	*KRAS* 2-F *KRAS* 2-R	5' GTGTGACATGTTCTAATATAGTCA 3' 5' GAATGGTCCTGCACCAGTAA 3'	214 pb	56 ºC
	3	*KRAS* 3-F *KRAS* 3-R	5' CCAGACTGTGTTTCTCCCTTC 3' 5' TGCATGGCATTAGCAAAGAC 3'	286 pb	58 ºC
NRAS	2	*NRAS* 2-F *NRAS* 2-R	5' CCAAATGGAAGGTCACACTA 3' 5' GATCCGACAAGTGAGAGACA 3'	287 pb	55 ºC
	3	*NRAS* 3-F *NRAS* 3-R	5' GCATTCCCTGTGGTTTTTA 3' 5' GCTCTATCTTCCCTAGTGTGG 3'	341 pb	53 ºC
BRAF	15	*BRAF* 15-F *BRAF* 15-R	5’ CATAATGCTTGCTCTGATAGGA 3’ 5’ TTTTTGTGAATACTGGGAACT 3’	303 pb	56 ºC
EGFR	18	*EGFR* 18-F *EGFR* 18-R	5’ CAAATGAGCTGGCAAGTGCCGTGTC 3’ 5’ GAGTTTCCCAAACACTCAGTGAAAC 3’	400 pb	62 ºC
	19	*EGFR* 19-F *EGFR* 19-R	5' CCCAGCAATATCAGCCTT 3’ 5' GCCTCCATTTCTTCATCCAA 3'	590 pb	56 ºC
	20	*EGFR* 20-F *EGFR* 20-R	5' CTCTCCCACTGCATCTGTCA 3’ 5' TATCTCCCCTCCCCGTATCT 3'	421 pb	58 ºC
	21	*EGFR* 21-F *EGFR* 21-R	5' TTCAAGCCCAGGTCTCAACT 3' 5' CAGCTGTGACCTTTCCCAAT 3'	775 pb	58 ºC
TP53	4	*TP53* 4-F *TP53* 4-R	5' TGCTCTTTTCACCCATCTAC 3' 5' ATACGGCCAGGCATTGAAGT 3'	353 pb	58 ºC
	5 e 6	*TP53* 5/6-F *TP53* 5/6-R	5' TGTTCACTTGTGCCCTGACT 3' 5' TTAACCCCTCCTCCCAGAGA 3'	467 pb	59 ºC
	7	*TP53* 7-F *TP53* 7-R	5' CTTGCCACAGGTCTCCCCAA 3' 5' AGGGGTCAGAGGCAAGCAGA 3'	237 pb	62 ºC
	8 e 9	*TP53* 8/9-F *TP53* 8/9-R	5' TTGGGAGTAGATGGAGCCT 3' 5' AGTGTTAGACTGGAAACTTT 3'	445 pb	56 ºC

Legenda: Cada iniciador encontra-se descrito em relação ao gene em que se anela, exon(s) de interesse, sequência de bases, tamanho do *amplicon* em pares de base (pb) e temperatura de anelamento (Ta) padronizada.
Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

4.5.4 Eletroforese (gel de acrilamida)

Após a PCR, fez-se a eletroforese como forma de verificar se o DNA extraído encontra-se na íntegro e constatar o funcionamento da PCR. A visualização das bandas ocorreu em um gel de poliacrilamida 6,5%. O protocolo de coloração envolveu uma etapa de fixação em ácido acético glacial 10%, lavagem em água destilada por 3 minutos, impregnação em solução de nitrato de prata, dupla lavagem em água destilada por 30 segundos, e, revelação foi em solução a base de carbonato de sódio, formaldeído e tiossulfato de sódio.

4.5.5 Purificação do produto de PCR

A purificação foi realizada com o produto de PCR, após verificar a sua eficácia via eletroforese. Esse processo foi realizado para eliminar os reagentes utilizados durante o processo de PCR, restos de nucleotídeos, e assim, manter somente o DNA amplificado para a reação de sequenciamento. A técnica de eletroforese foi utilizada novamente após a purificação para verificar se houve perda do conteúdo amplificado.

Fez-se a purificação do DNA com 20 µL de água milli-Q autoclavada e 60 µL de isopropanol 100%. Após, manteve-se por 15 minutos a temperatura ambiente e centrifugou-se por 25 minutos, a 14.000 g. O sobrenadante foi retirado por inversão e houve adição de 150 µL de Etanol 70% para lavagem. Por fim, centrifugou-se por mais 10 minutos, a 14.000 g. Descartou-se o sobrenadante e, após secagem, 35 µL de água milli-Q foi adicionada.

4.5.6 Reação de sequenciamento

A reação de sequenciamento dos produtos purificados de PCR foi realizada em fluxo laminar, conforme as especificações constatadas na Tabela 7.

Tabela 7 - Reação de sequenciamento

Reagente	Quantidade (1 amostra)	Etapas no termociclador
H_2O	2,5 µL	Passo 1: 96 ºC, por 1 minuto. Passo 2: 96 ºC, por 20 segundos. Passo 3: 50 ºC, por 15 segundos. Passo 4: 60 ºC, por 4 minutos. Passo 5: retornar no passo 2, 30 vezes. Passo 6: 8 ºC, por 30 minutos.
Primer F ou R*	1,0 µL	
Tampão	2,5 µL	
BigDye	1,0 µL	
Produto purificado	4,0 µL	

Legenda: Reagentes e quantidade para a reação de sequenciamento, com descrição das etapas no termociclador.
*Os primers da PCR são diluídos na proporção 4,5 µl de água para 2 µl de primer, e colocados separadamente.
Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

4.5.7 Precipitação da placa

Após a reação de sequenciamento, os produtos sequenciados foram precipitados diretamente na placa de 96 poços, utilizando EDTA (125 mM), Acetato de Sódio (3M) e etanol 100% (Merck), seguida de uma lavagem com etanol 70% (Merck). A placa, após precipitação, foi introduzida no sequenciador *ABI 3130 Genetic Analyzer* 4 capilares (*Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA*).

4.5.8 Análise do sequenciamento

Os cromatogramas gerados no sequenciador foram salvos em pastas organizadas por local (gene e exon) e por paciente. A análise de cada cromatograma ocorreu no programa Sequencher v.4.9, com pareamento da sequência obtida com a sequência referência correspondente ao trecho. Os transcritos utilizados para comparação foram *KRAS*: ENST00000256078; *NRAS*: ENST00000369535; *BRAF*: ENST00000496384; *EGFR*: ENST00000275493; *TP53*: ENST00000269305.

As alterações encontradas foram pesquisadas no navegador de genomas Ensembl e em bancos de dados, como o *Single Nucleotide 46 Polymorphism database* (dbSNP) e *Clinically relevant variation* (Clinvar) do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). As alterações identificadas no sequenciamento foram submetidas a uma análise *in silico*, para avaliar a patogenicidade da alteração sob a estrutura proteica. Para essa predição, utilizou-se três softwares online, são eles: *Polymorphism Phenotyping v2* (PolyPhen-2), *Sorting Tolerant From Intolerant* (SIFT) e *Protein Variation Effect Analyzer* (PROVEAN).

Os resultados do PolyPhen-2 são liberados de acordo com o escore, que varia de 0 a 1, e com um diagrama representativo. Prevê-se que as variantes com pontuação próxima de 0,0 sejam benignas e valores próximos de 1,0 caracterizam maior dano proteico. No SIFT, os resultados também são liberados em uma escala de 0 a 1, porém, quanto mais próximo de 0 mais danosa é a substituição. Na ferramenta PROVEAN, por sua vez, valores iguais ou inferiores a -2,5 classificam a alteração como “deletéria”, e acima de -2,5 como “neutra”.

4.5.9 Análise Estatística

Medidas de tendência central (média, mediana), juntamente com medidas de dispersão (desvio padrão) foram utilizadas para resumir o conjunto de dados. Análise de frequência absoluta possibilitou expressar o número de vezes que cada alteração genética apareceu no conjunto de dados, e a frequência relativa, os valores em porcentagem. Definiu-se o óbito

como desfecho primário. Variáveis secundárias, como as variantes alélicas, características clínicas, idade, gênero, tabagismo e etilismo, foram avaliadas.

Para a análise, aderiu-se a análise estatística não-paramétrica, considerando a natureza dos dados da pesquisa. Para a comparação de uma variável categórica, contendo dois níveis, com uma variável numérica, utilizou-se o teste de Wilcoxon, também conhecido como Mann-Whitney. Em grupos com mais de dois níveis na variável categórica, optou-se pelo teste de Kruskal-Wallis. A avaliação de associação entre duas variáveis categóricas foi verificada com o teste de Qui-quadrado.

Para avaliar as medidas de efeito, aplicou-se o teste da razão das chances. A razão é igual a 1, quando o risco for igual entre expostos e não expostos. Se for menor que 1, tem-se um fator de proteção, e, se for maior que 1, um fator de risco. Valores de p (p-valor) inferiores a 0,05 foram considerados estatisticamente significativos e todas as análises foram realizadas com o *software R* versão 3.5.1.

4.6 Aplicabilidade das alterações na técnica de Biópsia Líquida

A técnica de Biópsia Líquida foi otimizada e padronizada para verificar a alteração somática mais frequente no estudo, identificada por meio da análise molecular tecidual, descrita no tópico anterior (4.5 Análise molecular tecidual). Utilizou-se a técnica de PCR Digital (ddPCR) para a detecção do DNA tumoral circulante. O DNA do tumor, diluído para 2 ng/μL, foi utilizado como controle positivo, e a possibilidade de uso da técnica foi avaliada, a partir da concordância dos resultados do tecido e plasma. As etapas envolvidas encontram-se representadas na Figura 7, e, estão detalhadas nos subtópicos que seguem.

Figura 7 - Aplicabilidade na técnica de biópsia líquida

Legenda: Etapas para verificação da aplicabilidade das alterações moleculares na técnica de biópsia líquida, a partir da otimização e padronização realizada.
Fonte: Customizado pelo autor, com o BioRender (2021).

4.6.1 Separação do plasma

O sangue total, colhido em tubo EDTA, foi processado em no máximo duas horas após a coleta para a separação do plasma. Esse processo foi efetivado por meio de uma dupla centrifugação do sangue. Inicialmente, a 4 ºC, 1600 g, durante 10 minutos, com transferência do sobrenadante para eppendorf de 1,5 mL. A segunda centrifugação também foi realizada a 4 ºC e por 10 minutos, porém, com rotação de 16000 g. Posteriormente, o plasma foi aliquotado e acondicionado a - 80 ºC.

4.6.2 Isolamento do cfDNA

Visando o isolamento do cfDNA, que contempla o ctDNA, utilizou-se o kit MagMAX™ Cell‑Free DNA Isolation (Thermo Fisher/Catálogo: A29319). A opção 1 do protocolo segundo o fabricante, com adição de proteinase K, foi realizada. Utilizou-se 600 µL de plasma como volume inicial. O processo inicia-se com o rompimento dos exossomos - vesículas contendo o cfDNA. Após liberado, o cfDNA conecta-se às *beads* (esferas) magnéticas que, por sua vez, aproximam-se dos ímãs da raque magnética, possibilitando as etapas de lavagem. Ao final, o cfDNA foi separado das *beads*, sendo liberado em 15 µL do eluente. O cfDNA foi acondicionado em tubos de rosca, a - 20 ºC, até o momento da análise.

4.6.3 PCR Digital

Considerou-se a técnica de PCR Digital em gotas (ddPCR) como sendo a mais sensível e específica para a detecção do DNA do tumor circulante no plasma. Para sua realização, preparou-se a reação contendo água, sonda (BioRad), supermix (BioRad) e o cfDNA. Em seguida, ocorreu a geração das gotas (BioRad) e essas, após produzidas, foram transferidas para uma placa de 96 poços. A placa foi devidamente selada e acondicionada no termociclador, para o processo de amplificação. Por fim, a placa foi programada e sua leitura ocorreu no equipamento *QX200 Droplet Reader* (BioRad). Etapa realizada em colaboração com o Laboratório Personal Diagnósticos de Precisão.

Os resultados foram analisados no programa *Quanta Soft* (BioRad). Em um primeiro momento, avaliou-se a quantidade de gotículas geradas por poços. Exigiu-se, no mínimo, o número de 10.000 gotas para análise aceitável dos resultados. Atendido o critério da contabilidade de gotas, o gráfico 2D de amplitude foi verificado, a fim de avaliar se as amostras possuíam ou não a alteração em questão. Considerou-se como positivas as amostras com mais de três gotículas no quadrante mutado (Ch1+/Ch2-).

5 RESULTADOS

5.1 Perfil clínico dos pacientes

Um total de 42 pacientes com CCR foram incluídos no estudo. Ao todo, 84 amostras de tecido, sendo 42 amostras de tecido normal e 42 de tecido tumoral, foram coletadas. Majoritariamente, há pacientes do gênero masculino (59,5%, n: 25). A idade média dos participantes é de 63 anos (DP: 10,0; mín: 41; máx: 83). As amostras de tumor incluídas neste estudo foram representativas de todas as localizações tumorais, com maior predominância (38,1%) no reto. Dentre os pacientes, 20 (47,6%) foram diagnosticados em estágio inicial (I-IIA), e apenas 4 (9,5%) tinham diagnóstico de CCR metastático no início do estudo. O perfil clínico dos pacientes encontra-se resumido na Tabela 8.

Tabela 8 - Perfil clínico dos pacientes

Variáveis		Cólon				Reto	Total
		Direito	Transverso	Esquerdo*	Sigmóide		
Idade	**Média**	67	56	52	63	63	63
	Mediana	68	56	52	65	61	63
Gênero	**Masculino**	5	0	1	8	11	25
	Feminino	4	1	1	6	5	17
Etnia	**Branco**	2	0	0	5	5	12
	Negro	1	1	1	0	4	7
	Pardo	6	0	1	9	7	23
Estádio	**I**	0	0	0	2	1	3
	II	6	0	1	7	6	20
	III	2	0	0	5	7	14
	IV	1	1	0	0	2	4
TNM	**T1**	0	0	0	0	0	0
	T2	0	0	0	2	2	4
	T3	7	0	1	9	9	26
	T4	2	1	0	3	5	11
	N0	6	0	1	9	8	24
	N+	3	1	0	5	8	17
	M0/Mx	8	0	1	14	14	37
	M1	1	1	0	0	2	4

Legenda: Perfil dos pacientes em relação a idade média e mediana, e, número de pacientes de cada gênero, etnia autodeclarada e estadiamento.
*Dos pacientes com tumor no cólon esquerdo, um não tinha o estadiamento disponível.
Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Em relação à história clínica e familiar, 35 pacientes apresentavam pelo menos uma comorbidade (83,3%). As comorbidades mais relatadas foram hipertensão (64,2%), Diabetes Mellitus (19,0%), e obesidade (9,0%). Dentre os integrantes do estudo, 23 (54,8%) afirmaram história familiar de câncer, e 9 (21,4%), especificamente, histórico familiar de CCR. Até a última data de avaliação de acompanhamento, 4 pacientes (9,5%) apresentaram o desfecho de óbito. No que se refere à história de saúde, 6 pacientes (14,3%) eram tabagistas e 12 (28,6%) ex-tabagistas. 11 (26,2%) eram etilistas e 9 (21,4%) ex-etilistas.

5.2 Análise molecular

Alterações germinativas foram encontradas nos genes *EGFR* e *TP53* - Tabela 9. Nenhuma alteração foi detectada nos genes *NRAS* e *BRAF*. A tabela também resume as frequências encontradas no estudo e descritas no Ensembl, em relação ao parâmetro de menor frequência alélica (MAF) O Arquivo Brasileiro Online de Mutações (ABraOM) também foi consultado para levantamento da frequência em relação às variantes genômicas.

Tabela 9 - Alterações germinativas identificadas

Gene	Alteração	Especificações	Frequência			
			Pesquisa		MAF	ABraOM
			FA	FR		
EGFR	*rs17337107*	Intrônica	1	2,4%	2% (A)	3%
	rs17337135	Intrônica	4	9,5%	1% (A)	3%
	rs2017000	Intrônica	20	47,6%	33% (G)	26%
	rs17290378	Intrônica	5	11,9%	4% (C)	6%
	rs555226828	Intrônica	1	2,4%	<1% (A)	NR
	rs17290385	Intrônica	1	2,4%	1% (A)	1%
	rs712831	Intrônica	38	90,5%	33% (T)	78%
	rs10241451	Intrônica	23	24,8%	17% (C)	22%
	rs1050171	Exônica; Sinônima c.2361G>A; p.Gln787=	30	71,4%	43% (A)	54%
	rs17290552	Intrônica	3	7,1%	3% (G)	3%
	rs6970262	Intrônica	35	83,3%	25% (A)	65%
TP53	*rs1042522*	Exônica; Missense c.215C>G; p.Pro72Arg	36	85,7%	46% (G)	67%
	rs966675626	Intrônica	1	2,4%	<1%	<1%

Legenda: Alterações somáticas e sua localização no gene, alteração, especificações e análise da frequência. MAF: menor frequência alélica - reportada pelo Ensembl. FA: Frequência Absoluta. FR: Frequência Relativa. NR: Não Reportado.
Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Alterações somáticas foram encontradas em *KRAS* e *TP53*. A frequência encontrada no estudo foi reportada e os bancos de dados Ensembl e ABraOM também foram consultados. As especificações referentes às alterações somáticas encontram-se dispostas na Tabela 10.

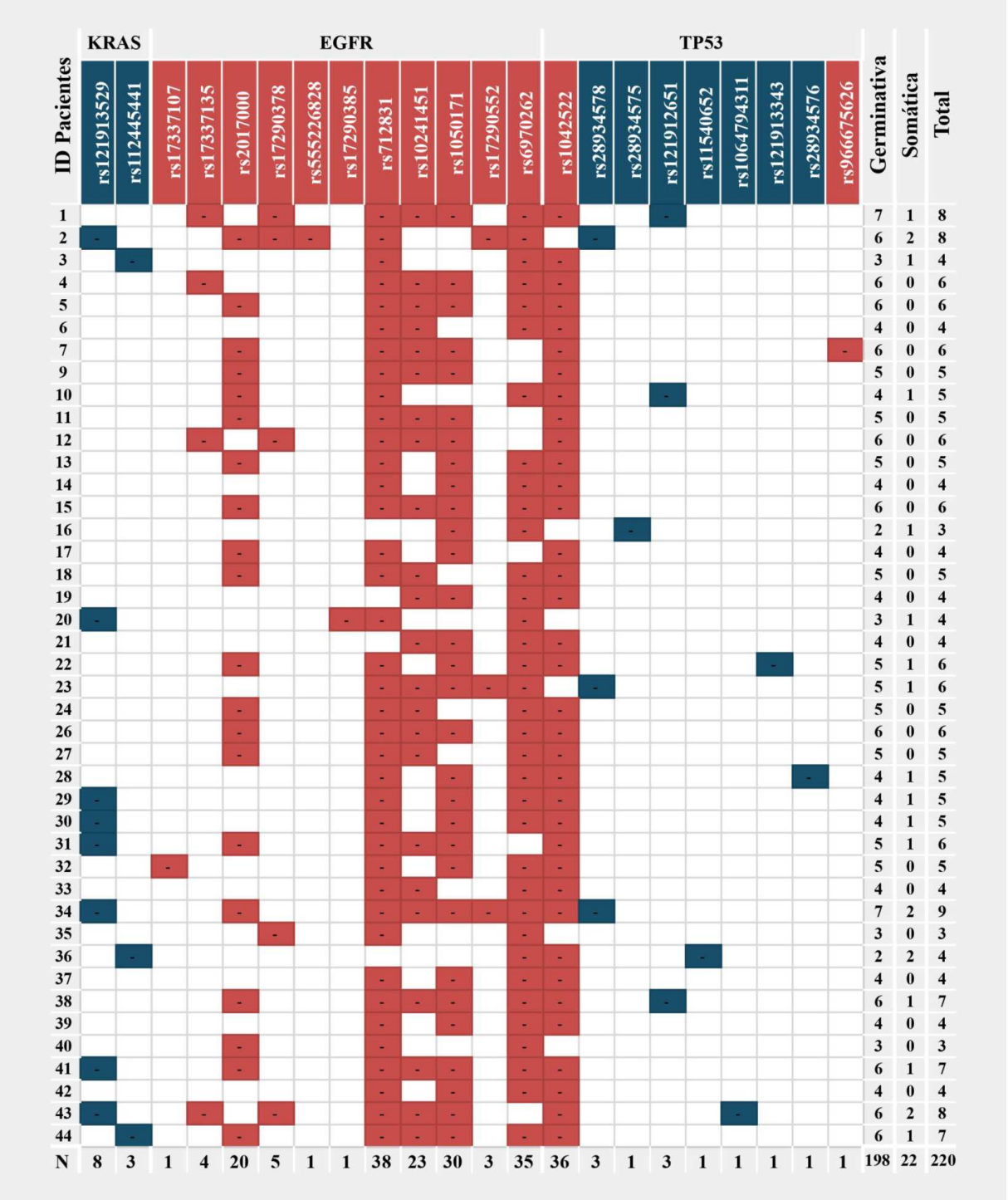
Tabela 10 - Alterações somáticas identificadas

Gene	Alteração	Especificações	Frequência			
			Pesquisa		MAF	ABraOM
			FA	FR		
KRAS	*rs121913529*	Exônica; Missense	8	19,1%	<1%	NR
		c.35G>T; p.Gly12Val	2	4,8%		
		c.35G>C; p.Gly12Ala	1	2,4%		
		c.35G>A; p.Gly12Asp	5	11,9%		
	rs112445441	Exônica; Missense c.38G>A; p.Gly13Asp	3	7,1%	<1%	NR
TP53	*rs28934578*	Exônica; Missense c.524G>A; p.Arg175His	3	7,1%	<1%	NR
	rs28934575	Exônica; Missense c.733G>A; p.Gly245Ser	1	2,4%	<1%	NR
	rs121912651	Exônica; Missense c.742C>T p.Arg248Trp	3	7,1%	<1%	NR
	rs11540652	Exônica; Missense c.743G>A; p.Arg248Gln	1	2,4%	<1%	NR
	rs1064794311	Exônica; Missense c.749C>T; p.Pro250Leu	1	2,4%	<1%	NR
	rs121913343	Exônica; Missense c.817C>T; p.Arg273Cys	1	2,4%	<1%	NR
	rs28934576	Exônica; Missense c.818G>A; p.Arg273His	1	2,4%	<1% (T)	NR

Legenda: Alterações somáticas e sua localização no gene, alteração, especificações e análise da frequência. MAF: menor frequência alélica. FA: Frequência Absoluta. FR: Frequência Relativa. NR: Não Reportado.
Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Dentre as alterações, a variante germinativa mais frequente foi a *rs712831* (EGFR), identificada em 38 (90,5%) participantes da pesquisa. Dentre as alterações somáticas, a *rs121913529* (KRAS), presente em 11 (26,2%) pacientes. Vale destacar que as alterações somáticas apresentaram menor frequência, se comparadas às germinativas. Além disso, nenhuma das alterações somáticas foi reportada no banco de dados brasileiro ABraOM. A distribuição das alterações por paciente, encontra-se ilustrada na Figura 8.

Figura 8 - Distribuição das variantes alélicas identificadas no estudo



Legenda: Distribuição das alterações encontradas no sequenciamento dos pacientes. As marcações em azul indicam as alterações somáticas, e, em vermelho, as alterações germinativas. ID Pacientes: Identificação dos pacientes. N: Número de vezes que a alteração apareceu.
Fonte: elaborado pelo autor (2022).

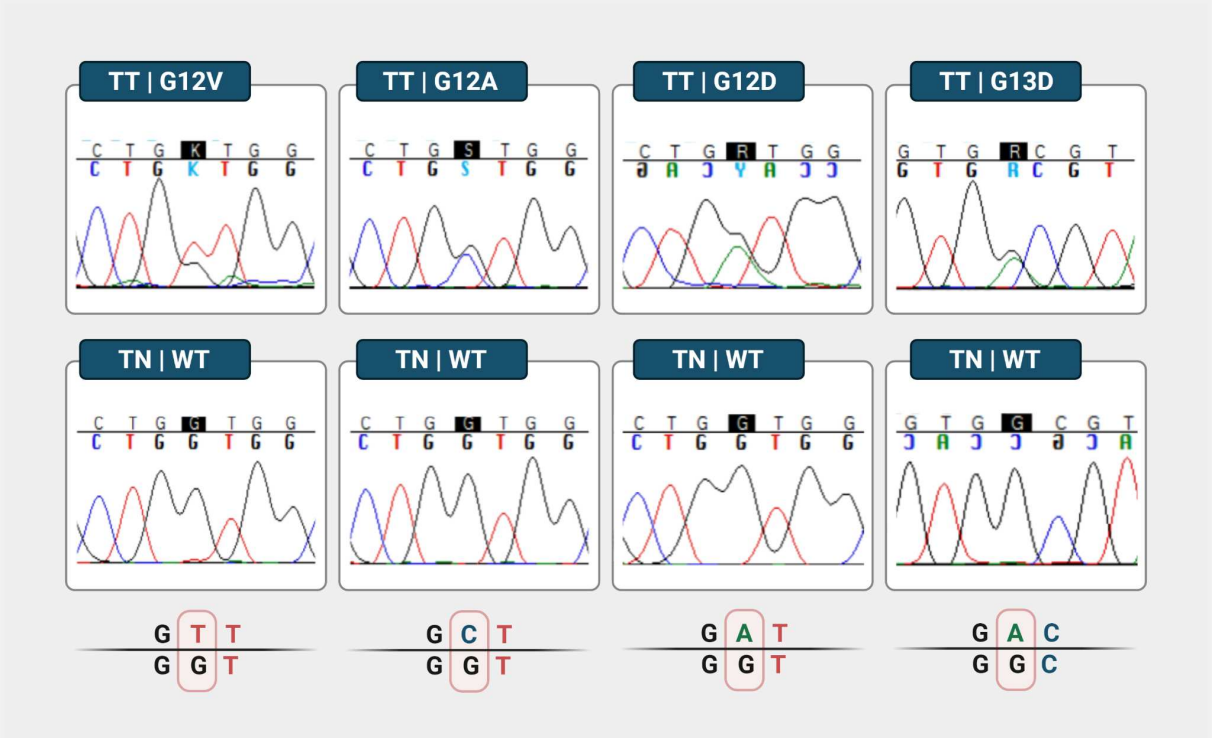
As alterações encontradas nos genes *KRAS*, *EGFR* e *TP53* encontram-se detalhadas nos itens subsequentes.

5.2.1 KRAS

KRAS foi analisado em todos os pacientes, por meio da análise de sequenciamento direto dos exons 2 e 3, conforme disposto na Tabela 6. Duas alterações foram encontradas no exon 2 de *KRAS* em heterozigose, uma no códon 12, outra no códon 13, conforme os cromatogramas expressos na Figura 9. Ambas alterações foram constatadas apenas em amostras de tecido tumoral, caracterizando-se como mutações somáticas, e são expressas como patogênicas, em pesquisa do significado clínico no Clinvar, com exceção da G12A.

A *rs121913529* identificada no códon 12 é multialélica. Dentre as três substituições encontradas, a mais frequente envolve a mudança de uma guanina (G) por uma adenina (A) na posição 35 em relação à fita codificante (c.35G>A), resultando em uma troca de glicina (Gly) por aspartato (Asp) na posição 12 da sequência de aminoácidos (p.Gly12Asp). A segunda mais frequente envolve a base timina (T); e o aminoácido valina (Val) na mesma posição (c.35G>T; p.Gly12Val). A menos frequente abarca uma substituição por citosina (C); com consequente mudança para alanina (Ala) no mesmo local (c.35G>C; p.Gly12Ala). No códon 13 de *KRAS*, a alteração detectada foi a *rs112445441* (c.38G>A; p.Gly13Asp).

Figura 9 - Alterações no exon 2 do gene *KRAS*



Legenda: Cromatogramas exibindo as variantes alélicas, detectadas em amostras de tecido tumoral (TT), mas não em tecido normal (TN) - somática. Destacado em preto no cromatograma, o local da substituição. Abaixo dos cromatogramas, o códon contendo a alteração (superior) e o de referência (inferior). WT: Selvagem.
Fonte: Registrado pelo autor, com o programa Sequencher v.4.9 (2021).

5.2.2 EGFR

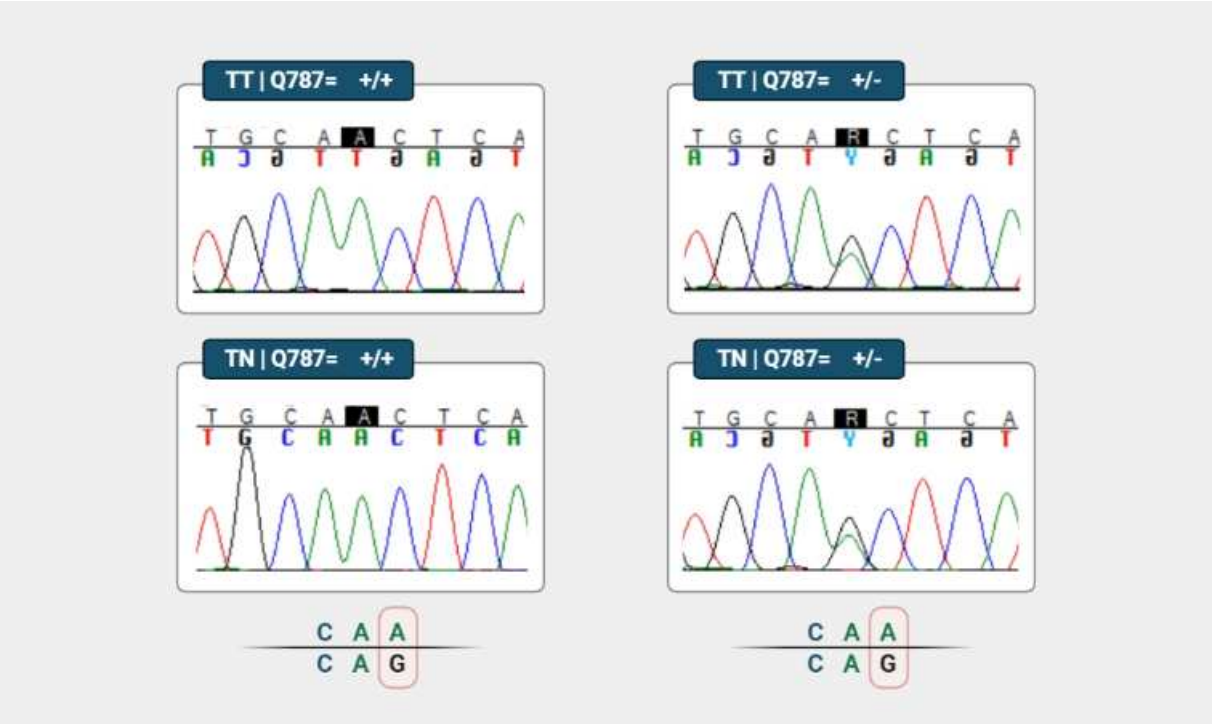
Analisou-se os exons 18 - 21 do gene *EGFR*, envolvidos na codificação do domínio da tirosina quinase. Um total de onze alterações foram encontradas, dez são variantes intrônicas e uma exônica. Alterações intrônicas foram identificadas entre os exons 18 e 19 (*rs17337107*), 19 e 20 (*rs17337135; rs2017000; rs17290378; rs555226828; rs17290385; rs712831* e a *rs10241451*), 20 e 21 (*rs17290552*), 21 e 22 (*rs6970262*). Algumas alterações mostraram-se em heterozigose e em homozigose, como se pode avaliar na Figura 10.

Figura 10 - Alterações intrônicas identificadas no *EGFR*

Legenda: Alterações em homozigose (+/+) e heterozigose (+/-). Destacado em preto no cromatograma, o local da substituição. Abaixo, a base inferior corresponde a referência, e a superior, a alterada.
Fonte: Registrado pelo autor, com o programa Sequencher v.4.9 (2021).

O polimorfismo, encontrado no exon 20 do gene *EGFR*, envolve a substituição de uma guanina (G) por uma adenina (A). Apesar da alteração na base nitrogenada, o aminoácido não é alterado (p.Gln787=), tratando-se de uma alteração sinônima. Por essa razão, é classificada como benigna, em consulta ao significado clínico no Clinvar. Essa alteração (*rs1050171*) foi identificada na amostra de tecido tumoral e normal (germinativa) de 30 (71,4%) dos casos. Em 19 dos casos apareceu em heterozigose, e no restante (11) em homozigose. Os cromatogramas representativos para essa alteração, em homozigose e heterozigose, encontram-se explícitos na Figura 11.

Figura 11 - Alteração exônica identificada no EGFR



Legenda: Alteração sinônima Q787= detectada em heterozigose (+/-) e homozigose (+/+), em amostras de tecido tumoral (TT) e normal (TN) - classificação em germinativa. Destacado em preto no cromatograma, o local da substituição. Abaixo dos cromatogramas, o códon contendo a alteração (superior) e o de referência (inferior).
Fonte: Registrado pelo autor, com o programa Sequencher v.4.9 (2021).

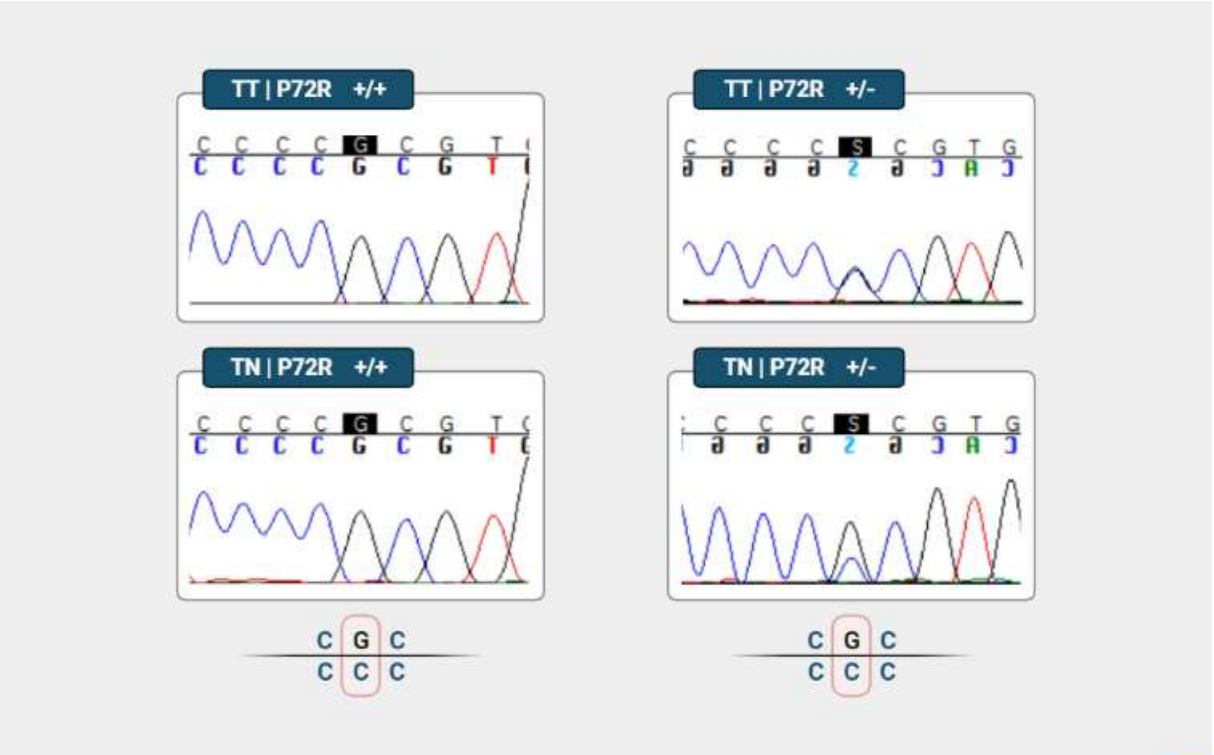
5.2.3 TP53

Na análise do gene *TP53* em 42 cânceres de intestino, sete alterações são somáticas, e duas são germinativas. Exons do 4 ao 9 de *TP53* foram analisados, e os resultados específicos para cada região, encontram-se descritos abaixo. Vale destacar que nenhuma alteração foi detectada no exon 6 e 9, das porções analisadas - conforme descrição da Tabela 6 - Especificações dos iniciadores.

5.2.3.1 Exon 4 do gene TP53

Identificou-se no exon 4 do gene *TP53* a *rs1042522* (c.215C>G; p.Pro72Arg) - Figura 12. A alteração P72R corresponde a uma variante germinativa e foi detectada em heterozigose e em homozigose, em 21 (50,0%) e 15 (35,7%) dos casos, respectivamente. Em consulta ao significado clínico no Clinvar, mencionou-se corresponder a um polimorfismo com resposta a fármacos.

Figura 12 - Alteração no exon 4 do gene *TP53*



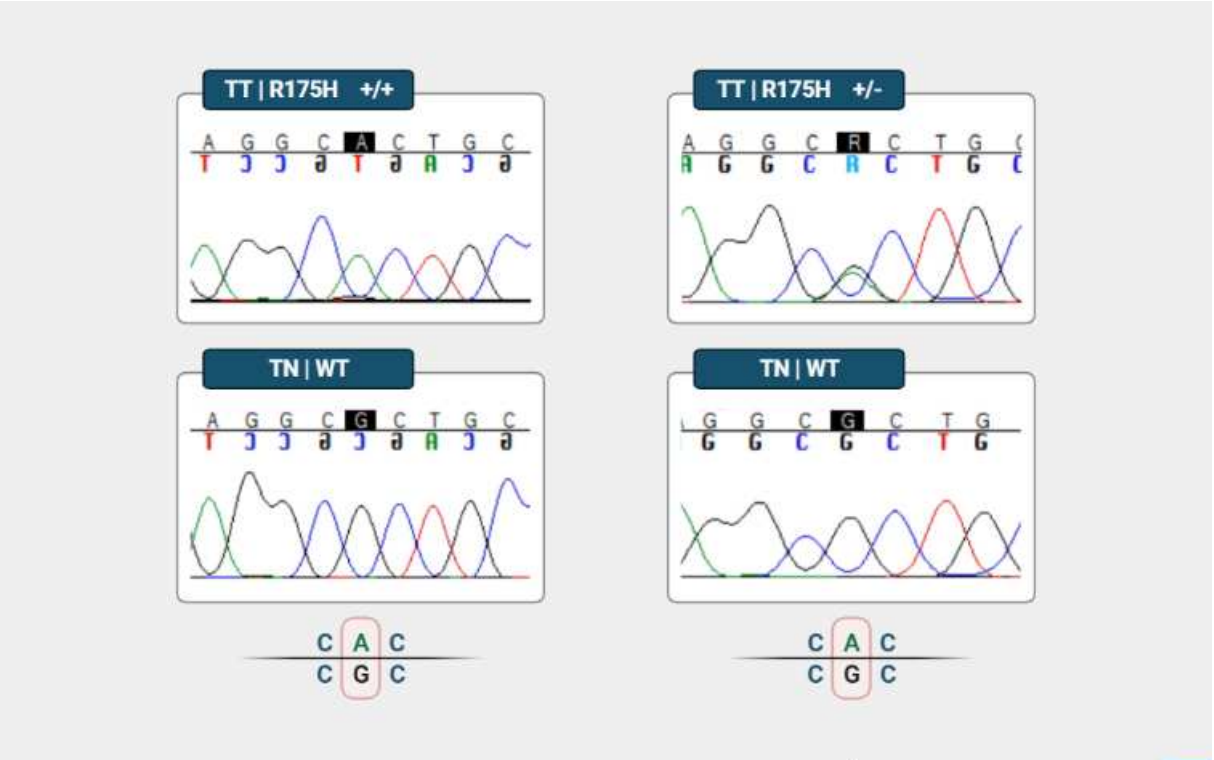
Legenda: P72R detectada em homozigose (+/+) e heterozigose (+/-), em amostras de tecido tumoral (TT) e normal (TN), sendo classificada como germinativa. Destacado em preto no cromatograma, o local da substituição. Abaixo dos cromatogramas, o códon contendo a alteração (superior) e o de referência (inferior).
Fonte: Registrado pelo autor, com o programa Sequencher v.4.9 (2021).

5.2.3.2 Exon 5 do gene TP53

A *rs28934578*, frequente em menos de 1% da população, foi identificada no exon 5 do gene *TP53*, (c.524G>A; p.Arg175His). A mutação apresenta caráter patogênico, de acordo com o Clinvar. Essa variante missense (R175H) foi identificada somente em amostras de tumor, não constando na amostra de tecido normal do paciente correspondente. Foi vista em homozigose em 1 paciente (2,4%), e em heterozigose nos outros 2 pacientes (4,8%) que a apresentaram.

A Figura 13 exibe os cromatogramas representativos desta alteração patogênica (*rs28934578*). Vale ressaltar que mais detalhes, a respeito do seu grau de patogenicidade sobre a estrutura proteica, serão abordados na análise predição *in silico* (item 5.3 - Impacto das alterações sobre a estrutura protéica).

Figura 13 - Alteração no exon 5 do gene TP53

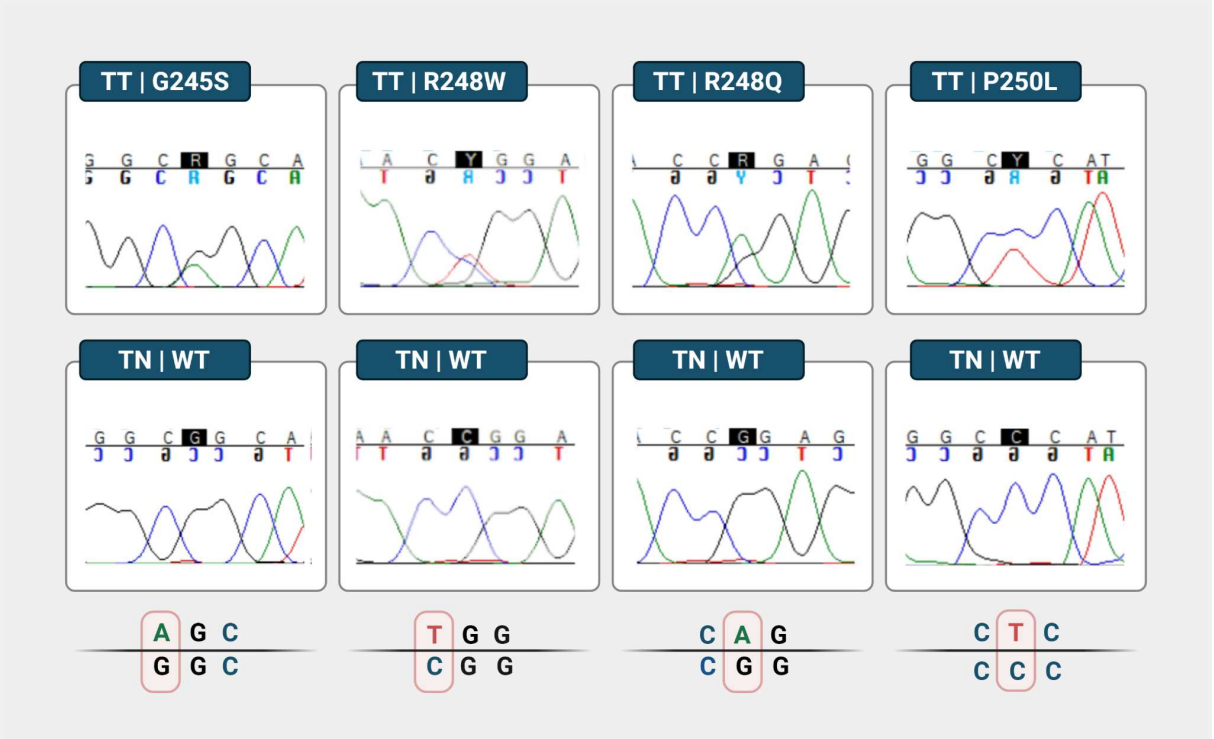


Legenda: R175H detectada em homozigose (+/+) e heterozigose (+/-), somente em em tecido tumoral (TT) - somática. Destacado em preto no cromatograma, o local da substituição. Abaixo dos cromatogramas, o códon contendo a alteração (superior) e o de referência (inferior). WT: Selvagem.
Fonte: Registrado pelo autor, com o programa Sequencher v.4.9 (2021).

5.2.3.3 Exon 7 do gene TP53

Quatro alterações somáticas (Figura 14) foram localizadas no exon 7 do gene *TP53*, são elas: *rs28934575* (c.733G>A; p.Gly245Ser), *rs121912651* (c.742C>T; p.Arg248Trp), *rs11540652* (c.743G>A; p.Arg248Gln) e *rs1064794311* (c.749C>T; p.Pro250Leu). Entre as quatro, a rs121912651 foi a mais frequente (7,1%). Todas foram identificadas em heterozigose. Em pesquisa do significado clínico, três (*rs28934575, rs121912651 e rs11540652*) exibiram significado clínico patogênico no Clinvar e apenas uma delas (*rs1064794311*) exibiu significado incerto. O exon 7 do gene *TP53*, dentre todos analisados no estudo, foi o que apresentou maior quantidade de alterações somáticas.

Figura 14 - Alterações no exon 7 do gene *TP53*



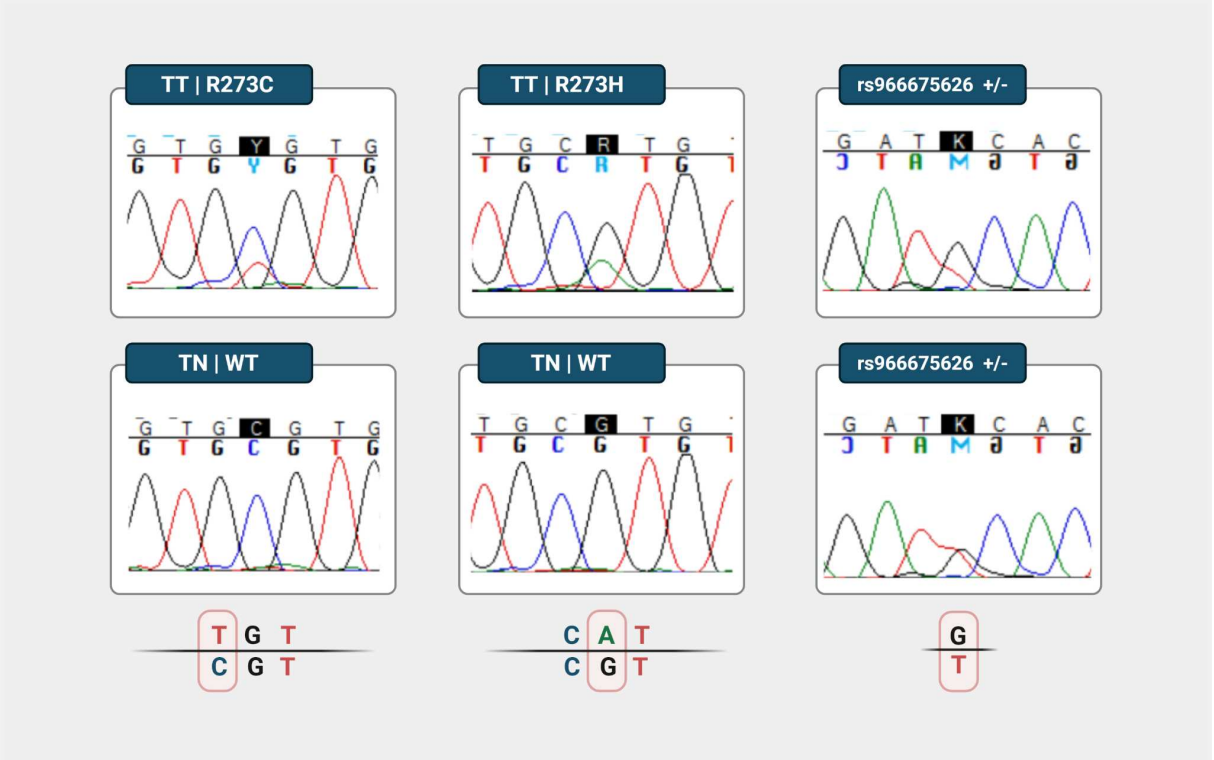
Legenda: Cromatogramas exibindo as variantes alélicas G245S, R248W, R248Q e P250L, detectadas no exon 7 do gene TP53. Foram encontradas em amostras de tecido tumoral (TT), mas não em tecido normal (TN) - classificação em somática. Destacado em preto no cromatograma, o local da substituição. Abaixo dos cromatogramas, o códon contendo a alteração (superior) e o de referência (inferior). WT: Selvagem.
Fonte: Registrado pelo autor, com o programa Sequencher v.4.9 (2021).

5.2.3.4 Exon 8 do gene TP53

O exon 8 apresentou duas alterações somáticas, e, entre o exon 8 e 9, localizou-se uma alteração intrônica. As alterações somáticas são a *rs121913343* (c.817C>T; p.Arg273Cys) e a *rs28934576* (c.818G>A; p.Arg273His). As duas alterações somáticas apareceram em heterozigose. Ao analisar o significado clínico na base de dados do Clinvar, as duas variantes foram classificadas como patogênicas. Mais detalhes, em relação ao impacto das variantes missenses encontradas no estudo sobre a estrutura proteica, estão presentes no tópico a seguir (4.3 - Impacto das alterações sobre a estrutura protéica).

A alteração intrônica (*rs966675626*) foi encontrada nas amostras de tecido tumoral e também no tecido normal, tratando-se, assim, de uma variante germinativa. A *rs966675626* foi a única alteração intrônica identificada no gene *TP53*, no presente estudo. Assim como as alterações somáticas detectadas, essa variante germinativa também foi encontrada em heterozigose. A figura 15 apresenta os cromatogramas das duas alterações somáticas e da alteração germinativa.

Figura 15 - Alterações no exon 8 e variante intrônica no gene *TP53*



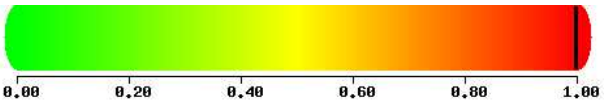
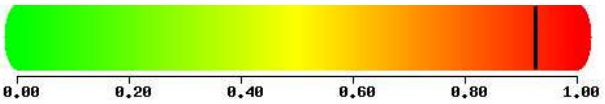
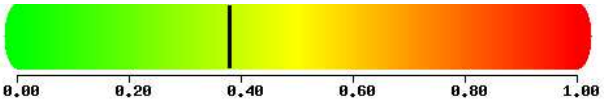
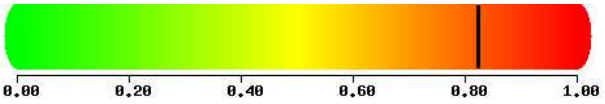
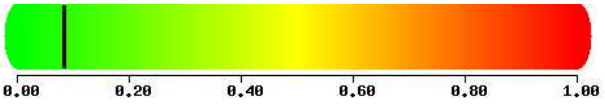
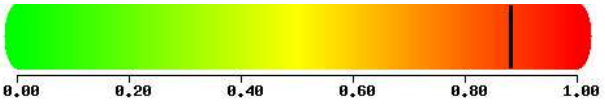
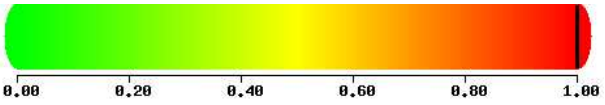
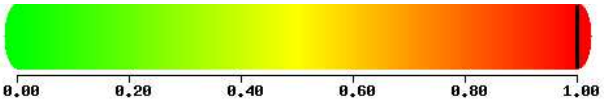
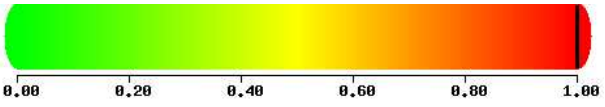
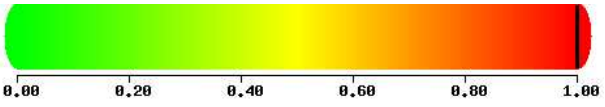
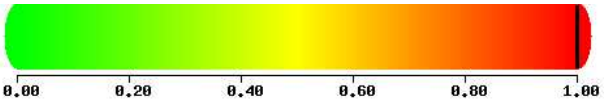
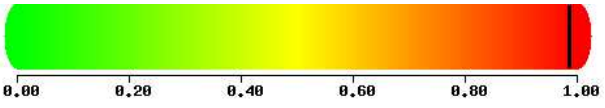
Legenda: Cromatogramas exibindo as alterações somáticas R273C e P250L, presentes no tecido tumoral (TT) e normal (TN). À direita, cromatogramas da alteração germinativa intrônica em heterozigose (+/-). Destacado em preto no cromatograma, o local da substituição. Abaixo dos cromatogramas, o códon contendo a alteração (superior) e o de referência (inferior). WT: Selvagem.
Fonte: Registrado pelo autor, com o programa Sequencher v.4.9 (2021).

A alteração somática mais frequente do estudo (*rs121913529* - *KRAS*) demonstrou associação com o etilismo (p = 0,002). Ainda no campo das alterações somáticas, observou-se que pacientes com mutação em *TP53* possuem dez vezes maior chance de irem a óbito, em comparação com a chance daqueles sem mutação nesse gene (OR 11,2; IC 95% 1,25 - 245).

5.3 Impacto das alterações sobre a estrutura protéica

Das 12 alterações missenses encontradas, 11 (91,7%) foram classificadas como deletérias pelo PROVEAN e as mesmas substituições, com exceção da G12D, também foram definidas como causadoras de possíveis ou prováveis danos no PolyPhen-2. A alteração G12D foi prevista como benigna no PolyPhen-2 e deletéria no PROVEAN. A variante P72R foi caracterizada como benigna no PolyPhen-2 e como neutra no PROVEAN, mantendo concordância da predição entre os bancos de dados. A Tabela 11 exprime a predição *in silico* das alterações encontradas no estudo.

Tabela 11 - Predição *in silico* das alterações

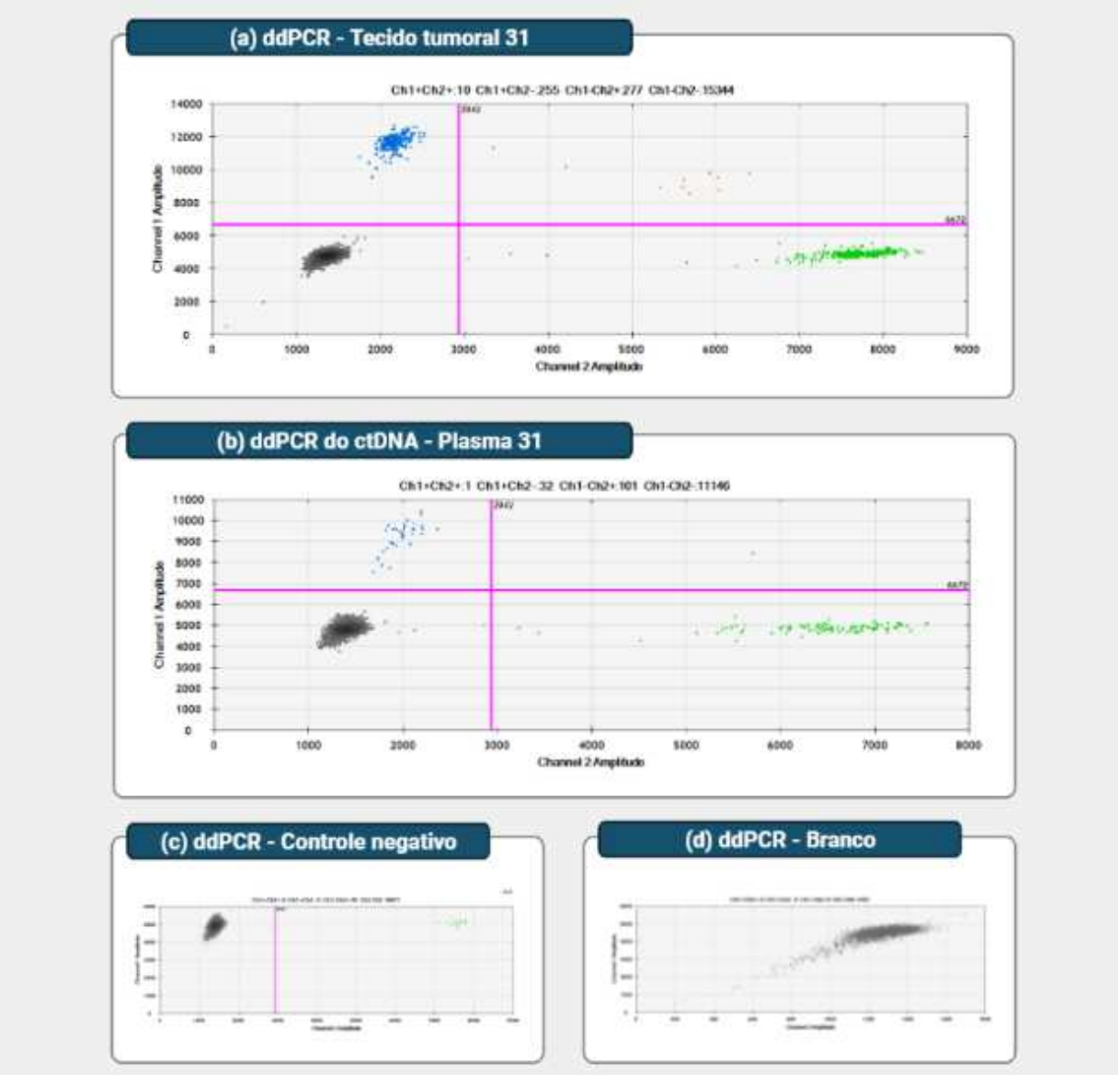
Alteração	Diagrama	Pontuação		
		PolyPhen	SIFT	Provean
G12V (*KRAS*)		Prováveis danos (0,998)	Afeta a proteína (0,00)	Deletéria (-7,113)
G12A (*KRAS*)		Possíveis danos (0,926)	Afeta a proteína (0,00)	Deletéria (-4,621)
G12D (*KRAS*)		Benigna (0,380)	Afeta a proteína (0,00)	Deletéria (-5,373)
G13D (*KRAS*)		Possíveis danos (0,823)	Afeta a proteína (0,00)	Deletéria (-5,403)
P72R (*TP53*)		Benigna (0,083)	Afeta a proteína (0,00)	Neutra (-0,230)
R175H (*TP53*)		Possíveis danos (0,881)	Afeta a proteína (0,00)	Deletéria (-4,872)
G245S (*TP53*)		Prováveis danos (1,000)	Afeta a proteína (0,00)	Deletéria (-5,877)
R248W (*TP53*)		Prováveis danos (1,000)	Afeta a proteína (0,00)	Deletéria (-7,826)
R248Q (*TP53*)		Prováveis danos (1,000)	Afeta a proteína (0,00)	Deletéria (-3,915)
P250L (*TP53*)		Prováveis danos (1,000)	Afeta a proteína (0,00)	Deletéria (-9,549)
R273C (*TP53*)		Prováveis danos (0,999)	Afeta a proteína (0,00)	Deletéria (-7,651)
R273H (*TP53*)		Prováveis danos (0,985)	Afeta a proteína (0,00)	Deletéria (-4,775)

Legenda: Alteração, diagrama gerado pelo PolyPhen 2 e pontuação das três ferramentas de predição.
Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

5.4 Biópsia líquida

Amostras de plasma de dois pacientes do estudo (BIO 30 e 31), positivos para a alteração somática KRAS G12D, foram utilizadas no processo de padronização e otimização da técnica de biópsia líquida. A quantidade de gotas geradas atendeu a quantidade mínima necessária para a análise. A figura 16 evidencia a detecção da alteração na amostra de tecido tumoral do paciente 31, e a mesma alteração identificada no ctDNA plasmático. Outros parâmetros também encontram-se expressos, como o controle negativo e o branco da análise.

Figura 16 - Análise do tecido tumoral e ctDNA por ddPCR



Legenda: Resultado positivo para a alteração G12D do gene *KRAS* por PCR Digital (ddPCR) para a amostra de de tecido tumoral (a), amostra de DNA tumoral circulante (ctDNA) no plasma (b). Abaixo, a esquerda (c), controle negativo para a alteração G12D. À direita (d), o branco - apenas reagentes, não há DNA presente.
Fonte: Registrado pelo autor, com o programa *Quanta Soft* (2022).

6 DISCUSSÃO

O advento da revolução técnico-científica e informacional trouxe uma série de contribuições, inclusive, no que se refere ao diagnóstico e tratamento de neoplasias malignas. Apesar disso, o CCR permanece como uma das principais causas de morte em todo o mundo (OLIVEIRA & HIRATA, 2018; CARDOSO et al., 2021). Desse modo, compreender as bases moleculares envolvidas no processo de carcinogênese favorece a identificação de biomarcadores genéticos influentes no manejo do paciente. Ademais, a aplicação prática desses marcadores também é considerável para melhores resultados.

Considera-se que os tumores colorretais surgem como resultado da ativação mutacional de oncogenes (proto-oncogenes alterados) com a inativação mutacional de genes supressores de tumor (PARREIRAS et al., 2013). Em nosso estudo, avaliamos os proto-oncogenes *KRAS, NRAS, BRAF* e o gene supressor de tumor *TP53*. Associado à via dos proto-oncogenes citados e ao processo de carcinogênese do CCR, encontra-se o gene *EGFR*, o qual também foi avaliado em nosso estudo.

Mutações oncogênicas de ativação de K-RAS geralmente conferem pior prognóstico, e são frequentemente observadas nas posições dos resíduos 12, 13 e 61 em pacientes com câncer (MOLINA-ARCAS, SAMANI & DOWNWARD, 2021). Segundo Vatansever, Erman & Gümüş (2019), entre esses, G12 é o resíduo mais frequentemente mutado (89%) e de forma mais recorrente, sofre mutação para aspartato (G12D, 36%) seguido por valina (G12V, 23%) e cisteína (G12C, 14%). Essa ordenação foi vista em nosso estudo referente à alteração G12D e G12V. Uma vez que a substituição por aspartato foi a mais ocorrente (11,9%), seguida de valina (4,8%) e alanina (2,4%). A troca por cisteína não foi observada em nossa análise.

Dentre as possibilidades de substituição, Hayama e colaboradores (2019) afirmaram que a colocação dos aminoácidos valina ou cisteína confere pior prognóstico no CCR primário, de pacientes em estágios TNM de I – III. Nossa análise *in silico* está de acordo com essa informação, uma vez que as ferramentas Polyphen-2, SIFT e PROVEAN predizem danos à estrutura da proteína, resultantes dessa alteração. A análise *in silico* também previu danos para a substituição G12A, condizente com os achados de Fiala et al. (2016), que averiguou menor sobrevida em pacientes com tumores G12V ou G12A. Acompanhamento dos pacientes do nosso estudo é uma proposta válida para melhor compreensão da relação entre G12A e a sobrevida.

No que tange a alteração G12D, as predições foram conflitantes. PolyPhen-2 caracterizou-a como benigna, enquanto SIFT e PROVEAN classificaram essa variante como danosa a proteína (0,00) e deletéria (-5,373), respectivamente. Em análise do significado das

mutações do RAS nas metástases pulmonares de pacientes com CCR, Igarashi e companhia (2019), sugerem que a mutação G12D, juntamente com a G13D, estão envolvidas na formação dessas metástases. Também condizente com resultados do SIFT e PROVEAN, Yuan e coparticipantes (2021), identificaram a mutação *KRAS* G12D associada a uma sobrevida inferior, tratando-se de um biomarcador de mau prognóstico em pacientes chineses com CCR.

A *rs121913529*, presente no códon 12 de *KRAS*, além de ser a alteração somática mais frequente (19,1%), apresentou associação com o etilismo (p = 0,002). Nossos dados são condizentes com os obtidos em estudo realizado por Sinha e estudiosos (2013). Assim como em nossa pesquisa, eles observaram que a ingestão de álcool foi significativamente associada à presença da mutação no códon 12 do gene *KRAS*, em pacientes indianos com CCR. Em relação ao total de pacientes do nosso estudo, 11 deles (26,2%) eram etilistas, e 9 (21,4%) ex-estilistas.

De fato, a ingestão de álcool, hábito cada vez mais comum e crescente na sociedade contemporânea, é listada como um dos principais fatores de risco para o CCR (ROSSI et al., 2018). Várias possibilidades são elencadas para o efeito do álcool no risco de CCR. Os metabólitos do álcool podem afetar diretamente a estabilidade do DNA e processos metabólicos que aumentam a formação de ROS também podem instigar dano ao DNA. Ademais, o etanol e seus metabólitos podem afetar a atividade de enzimas envolvidas no metabolismo do carbono único. Acreditamos que essas alterações no DNA possam explicar a conexão entre o etilismo e a *rs121913529* de *KRAS*.

Também de grande valia à medicina de precisão está a mutação G13D (*rs112445441*), identificada no códon 13 do gene *KRAS*. Esta alteração apresenta significado clínico patogênico, condizente com a predição de patogenicidade realizada em nosso trabalho. A detecção dessa alteração possibilita a aplicação de terapias direcionadas (MCFALL & STITES, 2020), uma vez que portadores dessa alteração respondem de forma positiva ao tratamento com cetuximabe - inibidor do *EGFR*.

Essa alteração confere abertura, inclusive, para discutir algumas generalizações que, embora contrastantes com os princípios da medicina de precisão, podem acontecer na prática. A exemplo, considerar que pacientes com alteração no gene *KRAS* não respondem bem às terapias anti-EGFR. Afirmação esta que não pode ser universalizada para todas as alterações em *KRAS*, na medida em que há evidências de pacientes com a mutação G13D beneficiados com cetuximabe (SEGELOV et al., 2016; NAKAMURA et al., 2017).

As alterações somáticas detectadas no proto-oncogene *KRAS* (*rs121913529* e *rs112445441*) exibem associação com o fenótipo do CCR, conforme evidenciado pela base de

dados Ensembl. Essa relação genótipo-fenótipo pode ser compreendida a partir da atuação da via RAS. Essa via, quando superativada, favorece as atividades de proliferação, diferenciação e sobrevivência celular - influentes na carcinogênese do tumor (VATANSEVER, ERMAN & GÜMÜŞ, 2019).

Além do proto-oncogene *KRAS, NRAS* e *BRAF* também foram avaliados e nenhuma alteração foi encontrada na análise molecular tecidual. De fato, mutações na família RAS em pacientes com câncer de intestino são mais frequentes no gene *KRAS* e raras em *NRAS* (IRAHARA et al., 2010). Essa afirmação, experienciável em nosso estudo, condiz com os dados de sequenciamento do genoma do câncer disponíveis publicamente do banco de dados COSMIC do Instituto Sanger.

De forma semelhante ao *NRAS*, alterações no gene *BRAF* também apresentam menor frequência. Em estudo realizado por Sanchez-Ibarra e colaboradores (2020), a respeito da prevalência das mutações *KRAS, NRAS* e *BRAF* em pacientes mexicanos com CCR metastático, 86% tinham uma mutação no *KRAS*, 8% no *NRAS* e 7% no *BRAF*. Distribuição percentual semelhante foi notória em estudo desenvolvido por Bożyk e associados (2021).

Em relação aos genes supressores de tumor, *TP53* foi analisado em nosso estudo. *TP53* é elencado nas relações genótipo-fenótipo do CCR (OMIM, 2021). McMurray et al. (2008) demonstram que vários genes controlados sinergicamente pela perda de função P53 e ativação de RAS possuem um papel crítico para o estado maligno de células do cólon humano. Em modelo animal, Vermeulen et al. (2013) quantificaram a vantagem competitiva durante o desenvolvimento do tumor e alterações em P53.

Manoharan e colaboradores (2020) descrevem que 95% das variantes patogênicas são encontradas entre o exon 5 e 8. Em nosso estudo, todas as variantes patogênicas encontradas em *TP53* estão entre os exons referidos (5-8), refletindo o percentual citado. Dentre todos os exons analisados, o exon 7 apresentou maior quantidade de alterações somáticas (G245S, R248W, R248Q e P250L), com predição *in silico* concordante, nos bancos de dados PolyPhen-2, SIFT e PROVEAN, para a existência de danos sobre a estrutura proteica.

A mutação G245S (*rs28934575*) já foi descrita como associada a um pior prognóstico para o CCR, evidenciando que pacientes com mutação G245S têm menor tempo de sobrevida, se comparados com pacientes sem essa alteração (XIAO et al, 2021). Isso ocorre, uma vez que pode desestabilizar várias regiões estruturais da proteína, que são cruciais para a ligação ao DNA (LEPRE et al., 2017). Conforme Kim e Lozano (2018), trata-se de uma mutação conformacional, em outras palavras, geram alterações estruturais relacionadas ao enovelamento das proteínas.

Outros tipos de variações correspondem às mutações de contato, como as mutações R248W (*rs121912651*) e R248Q (*rs11540652*) são classificadas. Nessa categoria, as alterações são capazes de produzir modificações estruturais na proteína P53, que afetam diretamente a ligação ao DNA (ALVARADO-ORTIZ et al., 2021). O que explica o fato da R248W afetar a superfície de ligação da P53 ao DNA (DOMINIJANNI & GMEINER, 2018), reduzindo a afinidade da P53 no DNA e, assim, impedir sua atividade transcricional (JOERGER & FERSHT, 2016). A categorização de tais alterações também reflete nossos resultados de predição proteica.

A mutação P250L (*rs1064794311*) foi descrita em um estudo feito com indivíduos com CCR (MAMLOUK et al., 2020). No estudo, essa alteração foi identificada em apenas uma das três regiões de adenoma de uma amostra. Em nossa pesquisa, em concordância, P250L foi observada em apenas um paciente. São escassos os estudos na literatura que citam essa alteração. Sua descrição ocorre em estudos com mieloma múltiplos (FLYNT et al., 2020), Síndrome de Li-Fraumeni (FUNATO et al., 2021) e angiosarcomas esporádicos (KIM et al., 2021). Nenhuma dessas condições foram relatadas no histórico clínico do nosso paciente com a variante P250L, como comorbidade, apresentou diabetes mellitus e hipertensão.

O exon 8 do gene *TP53* foi o segundo a apresentar maior quantidade de alterações patogênicas em nosso estudo (R273C e R273H). Entre o exon 8 e 9, a *rs966675626* intrônica foi identificada, porém, sem publicações associadas. Em estudo desenvolvido por Lin e colaboradores (2021), a R273C (*rs121913343*) foi elencada como alvo potencial para imunoterapia. A R273H (*rs28934576*), uma mutação também de contato (HUANG et al., 2021), demonstrou estimular as células cancerígenas a gerar células-tronco cancerígenas (HOSAIN et al., 2016). Mutações no códon 273 foram relatadas ainda por mostrar resistência aumentada aos fármacos paclitaxel, cisplatina e doxorrubicina (SHAJANI-YI et al., 2018).

No exon 5 uma única variante foi encontrada, a R175H (*rs28934578*), também patogênica, identificada em 7,1 % dos pacientes integrantes. Essa mutação foi vista como associada ao crescimento do tumor e à metástase no CCR (CHIANG et al., 2021). Em estudo realizado por Humpton et al. (2018), tumores contendo a mutação R175H foram resistentes a condições limitadas em serina e menos responsivos à terapia, exibindo piores resultados. Ainda no campo terapêutico, a mutação R175H foi elencada como um alvo promissor para imunoterapias contra o câncer (MALEKZADEH et al., 2019).

Em estudo realizado por Khromova e demais participantes (2009), as variantes missenses R175H, R248W, R273H, também encontradas no presente estudo, aumentam a

vascularização do tumor através da ativação mediada por espécies reativas de oxigênio (ROS). Os autores sugeriram que a combinação de drogas antiangiogênicas com antioxidantes pode potencializar a eficácia terapêutica de tumores que apresentam disfunção de P53. Chiang e participantes (2021) apontam as funções das alterações R273H, R248W e R248Q como semelhantes às do R175H, altamente dependente do contexto celular.

Em nosso estudo, observamos que pacientes com mutação somática em *TP53* possuem dez vezes maior chance de irem a óbito, em comparação com a chance daqueles sem mutação nesse gene supressor de tumor (OR 11,2; IC 95% 1,25 - 245). Essa associação pode ser explicada, posto que alterações envolvendo a proteína P53 podem resultar em efeitos anti-apoptóticos, contribuindo para a sobrevivência das células cancerosas. Ademais, a relação das alterações encontradas com a resistência a quimioterápicos, ou alterações na motilidade e invasividade (OLSZEWSKI et al., 2019), reforça esse achado.

Encontramos também no gene *TP53* uma alteração germinativa, a *rs1042522* (P72R), localizada no exon 4. Esse polimorfismo, presente em 85,7% dos pacientes, foi descrito como de resposta a fármacos. Very, Lefebvre & Yazidi-Belkoura (2018) apontam que essa variante aumenta a função da proteína, com maior capacidade de ligação ao DNA e ativação da transcrição de genes alvo.

Desse modo, pacientes com essa substituição com ganho de função se beneficiam mais das quimioterapias a base do fármaco fluorouracil (5-FU). Essa alteração, apesar de ser classificada como benigna pelo Clinvar e aparatos de predição *in silico*, em estudo feito por Elshazli e colaboradores (2020), associou-se com risco aumentado de CCR, a partir de 59 estudos de caso-controle examinados. Estudo realizado por Dong e demais pesquisadores (2018) fortalecem essa informação. De acordo com eles, essa variante está associada ao risco de CCR em indivíduos asiáticos.

Dominguez-Valentin e pesquisadores associados (2018) sugeriram que a análise de genes atualmente excluídos das telas de diagnóstico genético de rotina pode conferir informações de suscetibilidade ao câncer. Esses achados instigam o pesquisador a analisar de forma mais aprofundada, para além das informações primárias existentes. A mesma interpretação aplica-se às alterações intrônicas, muitas vezes negligenciadas nas investigações de diagnóstico molecular.

Nessa perspectiva, o gene *EGFR* foi destaque em abranger alterações intrônicas, com um total de 10 alterações identificadas (*rs17337107, rs17337135, rs2017000, rs17290378, rs555226828, rs17290385, rs712831, rs10241451, rs17290552* e *rs6970262*). Dentre elas, *rs555226828* foi a única a apresentar MAF inferior a 1%, e sua frequência não foi relatada no

banco de dados brasileiro (ABraOM). A *rs17337135* e a *rs17290385* apresentaram MAF de exatamente 1%, e o restante MAF superior a 1%, com frequência descrita no banco brasileiro.

A *rs555226828* foi encontrada em apenas 1 (2,4%) dos 42 pacientes avaliados em nosso estudo, com estádio IIb e tumor localizado no cólon direito. Em busca por essa mutação nas bases de dados PubMed e ScienceDirect nenhuma publicação foi encontrada. O mesmo ocorreu para a *rs17290385*, *rs17290378* e *rs17290552*. Um único artigo sobre a *rs17337135*, publicado em 2012 por Abedi-Ardekani e colaboradores, foi identificado. Esses pesquisadores estudaram alterações do EGFR no carcinoma de células escamosas do esôfago, na Ásia central. Condizente com a frequência em nosso estudo, essa variante também foi detectada em um único paciente.

A *rs17337107* também foi encontrada em apenas 1 (2,4%) paciente, assemelhando-se à frequência avaliada em estudo de Castro Junior e colaboradores (2018), em pacientes com câncer de esôfago. Em nosso estudo, foi identificada a heterozigose em um paciente com estágio IIa e tumor localizado no reto. Essa variante também foi identificada em outros tumores, como o neuroblastoma (MAO et al., 2017) e no carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (MAITI et al., 2013). No entanto, nenhum estudo foi encontrado abordando essa alteração no CCR; o que também se aplica a *rs10241451*, investigada em carcinoma espinocelular de pulmão, por Sung, Cho & Lee (2020).

A *rs2017000* foi vista em 47,6% dos pacientes em nosso estudo. Essa mesma variante exibiu associação com o risco de câncer do trato biliar (CTB), conforme Meng (2014). Em sua abordagem analítica, a presença dessa alteração em homozigose (G/G) foi significativamente maior no grupo de pacientes com CTB, em comparação com grupos de pessoas de outros genótipos.

A variante intrônica mais frequente em nosso estudo foi a *rs712831* (90,5%), seguida pela *rs6970262* (83,3%). Apesar de muito frequente, o mesmo não foi visto para a *rs712831* em relação à literatura, visto que foi descrita em apenas uma publicação, feita por Edvardsen e demais envolvidos (2013). Esses pesquisadores identificaram a *rs712831* como associada à expressão de mRNA de 14 genes previamente ligados à fibrose. A *rs6970262* associou-se à doença de Alzheimer (TALWAR et al., 2021) e ao risco de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço - HNSCC (FUNG et al., 2014). No entanto, nenhum estudo foi encontrado abordando essa variação genética e o CCR.

A evidência de poucos estudos com variantes intrônicas, conforme explicitado, reforça a necessidade de mais estudos voltados a esse tipo de alteração. A baixa evidência de estudos que correlacionam essas variantes em pacientes com CCR indica a requisição de mais

trabalhos, inclusive, nessa população. Vale enfatizar que, conforme defendido por Lange, Begolli & Giakountis (2021), a detecção e caracterização dessas alterações presentes em regiões não codificantes podem melhorar a avaliação de risco para portadores saudáveis e expandir a caixa de ferramentas de diagnóstico e terapêutica para o paciente.

Em relação às alterações exônicas em *EGFR*, identificou-se a *rs1050171* (Q787= ou Q787Q) em 30 (71,4%) casos. Esse polimorfismo sinônimo mostrou estar associado à melhora da sobrevida global em pacientes com CCR em estudo desenvolvido por Leichsenring et al. (2016). O que está interligado com achados de Giordano et al. (2019), que apresentou a *rs1050171* como um potencial polimorfismo preditivo da eficácia de anticorpos anti-EGFR no CCR. De forma complementar, Bonin e companhia (2016) perceberam que pacientes com esse polimorfismo apresentam melhor evolução clínica após tratamento anti-EGFR, independentemente do estado mutacional do RAS.

No que tange a aplicabilidade dos biomarcadores à rotina do câncer de cólon, algumas abordagens são consideradas limitantes. A biópsia tecidual, método padrão-ouro para o diagnóstico do CCR, compreende um procedimento dispendioso, invasivo e por vezes inacessível, a depender do tamanho e localidade do tumor (QIN et al., 2016; GERMANO et al., 2018; NORMANNO et al., 2018). Além disso, a biópsia tradicional expressa informações limitadas do perfil molecular, a partir da heterogeneidade tumoral, e impossibilita a coleta seriada de amostras (SCHØLER et al., 2017; LU & LI, 2017; OSUMI et al., 2019).

Dentro dessa perspectiva, desenvolvemos uma prova de conceito com padronização e otimização da biópsia líquida, uma técnica que oferece benefícios sobre todas as dificuldades elencadas para a biópsia tecidual. Averiguou-se uma correspondência entre a identificação da alteração somática mais frequente em nosso estudo (G12D) em amostra de tecido, por sequenciamento de Sanger, e, a detecção dessa alteração no ctDNA plasmático, por ddPCR. Alguns aspectos da padronização em nossa pesquisa favorecem a aplicação na prática clínica. Na padronização realizada, destacamos o uso do tubo EDTA, interessante por ser um material de menor custo e já utilizado rotineiramente nos hospitais para análise hematológica, e, o volume de plasma inferior a 1 mL (600 µL).

Em pesquisa na base de dados PubMed e Sciencedirect pelo número de catálogo do kit utilizado (A29319), seis artigos, publicados entre 2018 e 2021, foram encontrados. Dentre eles, dois estudos não especificaram o tipo de tubo utilizado para a coleta, nem o volume de plasma requerido para o isolamento do cfDNA (PARK et al., 2021; STARK et al., 2021). Dos estudos restantes, nenhum abordou o uso de tubo EDTA e volume de plasma inferior a 1 mL, concomitantemente (DIEFENBACH et al., 2018; FRIBBENS et al., 2018; LEE et al., 2018;

ZHOU et al., 2020). Em comum, nenhum dos seis estudos avaliaram a biópsia líquida aplicada ao CCR.

Nesse contexto, a otimização realizada, em conjunto com a técnica de ddPCR, altamente sensível, demonstra ser uma combinação favorável à análise do ctDNA, inclusive, quando há menos amostra disponível para análise. Além de requerer menos materiais e reagentes, o que é útil para a aplicação em serviços que dispõem de menos recursos. Por conseguinte, nosso estudo reforça a proficuidade da técnica de biópsia líquida como uma ferramenta relativamente acessível, do ponto de vista financeiro, eficiente e não invasiva.

Convém ressaltar alguns pontos limitantes do nosso estudo. Em relação à análise genética, o sequenciamento de Sanger, utilizado para estudo dos genes elencados, embora seja a técnica padrão ouro, é menos sensível que outros métodos moleculares, como a ddPCR, também utilizada na pesquisa. Em relação à análise estatística, o número amostral configura-se também como um fator limitativo, abarcando resultados exploratórios que requerem estudos adicionais, com maior número amostral. Por fim, o desdobramento do estudo em pesquisas de modelagem *in vitro* e *in vivo* também abrange potencial para expandir o entendimento das bases moleculares do CCR.

7 CONCLUSÃO

O estudo alcançou os objetivos almejados, haja vista que identificou variantes alélicas influentes no câncer colorretal, identificou associação da *rs121913529* com o etilismo, e a presença de alterações somáticas em TP53 com o desfecho óbito. Estimou a frequência de alterações germinativas e somáticas identificadas nos genes KRAS, EGFR e TP53. Ademais, elencou a biópsia líquida, via PCR digital, como uma alternativa benéfica à aplicação prática das alterações somáticas. Dentre as regiões analisadas, o exon 2 do gene *KRAS* e o exon 7 do gene supressor de tumor *TP53* destacaram-se na avaliação molecular, à medida que exibiram alterações somáticas com frequência, variedade e significado clínico consideráveis. De forma complementar, reforça-se a necessidade de mais abordagens abarcando as variantes intrônicas, também pertinentes e com potencial para ampliar as ferramentas de diagnóstico molecular.

REFERÊNCIAS

ABEDI-ARDEKANI, B. et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations and expression in squamous cell carcinoma of the esophagus in central Asia. **BMC Cancer**, v. 12. 2012.

ALVARADO-ORTIZ, E. et al. Mutant p53 Gain-of-Function: Role in Cancer Development, Progression, and Therapeutic Approaches. **Frontiers in Cell and Developmental Biology,** v. 8, 11 fev. 2021.

ARCHAMBAULT, A. N. et al. Cumulative Burden of Colorectal Cancer–Associated Genetic Variants Is More Strongly Associated With Early-Onset vs Late-Onset Cancer. **Gastroenterology**, v. 158, n. 5, p. 1274-1286. 1 abr. 2020.

ARNOLD, M. et al. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. **Gut**, v. 66, n. 4, p. 683–691, 1 abr. 2017.

BARROS, B. D. DE F. et al. Mutation detection in tumor-derived cell free DNA anticipates progression in a patient with metastatic colorectal cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 8, 10 ago. 2018.

BENEDETTO, A. et al. Analysis of the ATR-Chk1 and ATM-Chk2 pathways in male breast cancer revealed the prognostic significance of ATR expression. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 1 dez. 2017.

BERTOLI, C.; SKOTHEIM, J. M.; DE BRUIN, R. A. M. Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 14, n. 8, p. 518–528. ago. 2013.

BONIN, S. et al. A synonymous EGFR polymorphism predicting responsiveness to anti-EGFR therapy in metastatic colorectal cancer patients. **Tumour Biol**, v. 37, n. 6, p. 7295-303, jun. 2016.

BOQUETT, J. A.; FERREIRA, R. J. Aspectos biológicos e atividade tumorigênica da família proto-oncogênica Ras. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 31, n. 2, p. 201-211, 2010.

BOŻYK, A. et al. Correlation between KRAS, NRAS and BRAF mutations and tumor localizations in patients with primary and metastatic colorectal cancer. **Archives of Medical Science**, 24 mar. 2021.

CAFIERO, C. et al. KRAS and BRAF Concomitant Mutations in a Patient with Metastatic Colon Adenocarcinoma: An Interesting Case Report. **Case Reports in Oncology**, v. 13, n. 2, p. 595–600, 2020.

CARDOSO, R. et al. Colorectal cancer incidence, mortality, and stage distribution in European countries in the colorectal cancer screening era: an international population-based study. **The Lancet Oncology**, v. 22, n. 7, p. 1002–1013, 1 jul. 2021.

CARNEIRO NETO, J. D. et al. Câncer colorretal: características clínicas e anatomopatológicas em pacientes com idade inferior a 40 anos. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v. 26, n. 4, p. 430–435, dez. 2006.

CHENG, W. L. et al. The role of ereg/egfr pathway in tumor progressionInternational Journal of Molecular. **Science,** 1 dez. 2021.

CHIANG, Y. T. et al. The function of the mutant p53-r175h in cancer. **Cancers**, 13 ago. 2021.

DE CASTRO JUNIOR, G. et al. A randomised phase II study of chemoradiotherapy with or without nimotuzumab in locally advanced oesophageal cancer: NICE trial. **European Journal of Cancer**, v. 32, p. 21–30, 2014.

DIEFENBACH, R, J. et al. Evaluation of commercial kits for purification of circulating free DNA. **Cancer Genetics**, dez. 2018.

DOMINGUEZ-VALENTIN, M. et al. Identification of genetic variants for clinical management of familial colorectal tumors. **BMC Medical Genetics**, v. 19, n. 1, 20 fev. 2018.

DOMINIJANNI, A.; GMEINER, W. H. Improved potency of F10 relative to 5-fluorouracil in colorectal cancer cells with p53 mutations. **Cancer Drug Resistance**, v. 1, n. 1, p. 48–58, 2018.

DONG, Z. et al. Association of mRNA expression of TP53 and the TP53 codon 72 arg/pro gene polymorphism with colorectal cancer risk in asian population: A bioinformatics analysis and meta-analysis. **Cancer Management and Research**, v. 10, p. 1341–1349, 25 maio 2018.

EDVARDSEN, H. et al. SNP in TXNRD2 Associated With Radiation-Induced Fibrosis: A Study of Genetic Variation in Reactive Oxygen Species Metabolism and Signaling, **International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics**, v. 86, n. 4. 12 jul. 2013.

ELSHAZLI, R. M. et al. Genetic polymorphisms of TP53 (rs1042522) and MDM2 (rs2279744) and colorectal cancer risk: An updated meta-analysis based on 59 case-control studies. **Gene Elsevier**, v. 734, 15 abr. 2020.

FIALA, O. et al. G12V and G12A KRAS mutations are associated with poor outcome in patients with metastatic colorectal cancer treated with bevacizumab. **Tumor Biology**, v. 37, p. 6823–6830, 2016.

FILHO, G, B. Bogliolo - Patologia. 10ª edição. Rio de Janeiro: **Guanabara-Koogan**, 2021.

FILIPSKI, K. K. et al. Pharmacogenomics in oncology careFrontiers in Genetics. **Frontiers Research Foundation,** 2014.

FLYNT, E. et al. Prognosis, Biology, and Targeting of TP53 Dysregulation in Multiple Myeloma. **Cells**, v. 9, n. 2, 24 jan. 2020.

FRIBBENS, C. et al. Tracking evolution of aromatase inhibitor resistance with circulating tumour DNA analysis in metastatic breast cancer. **Annals of Oncology**, v. 29, n. 1, p. 145-153, jan. 2018.

FUNATO, M. et al. Characteristics of Li‐Fraumeni syndrome in Japan: A review study by the special committee of JSHT. **Cancer Sci**, v. 112, n.7, p. 2821–2834. 1 May. 2021.

FUNG, C. et al. Identification of epidermal growth factor receptor (EGFR) genetic variants that modify risk for head and neck squamous cell carcinoma. **Cancer Letters**, v. 357, n. 2, p. 549–556, 28 fev. 2015.

GENE. BRAF - proto-oncogene, serine/threonine kinase. **NCBI**. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/673>. Acesso em 15 jul. 2021.

GENE. EGFR - Epidermal growth factor receptor. **NCBI**. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1956>. Acesso em 15 jul. 2021.

GENE. KRAS - proto-oncogene, GTPase. **NCBI**. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3845>. Acesso em 15 jul. 2021.

GENE. TP53 - tumor protein p53. **NCBI**. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7157>. Acesso em 15 jul. 2021.

GERMANO, G. et al. Parallel Evaluation of Circulating Tumor DNA and Circulating Tumor Cells in Metastatic Colorectal Cancer. **Clinical Colorectal Cancer**, v. 17, n. 1, p. 80–83, 1 mar. 2018.

GIORDANO, G. et al. Immune resistance and egfr antagonists in colorectal cancer. **Cancers**, 1 ago. 2019.

GLAYSHER, S. et al. Activity of EGFR, mTOR and PI3K inhibitors in an isogenic breast cell line model. **BMC Research Notes**, v. 7, n. 1, 25 jun. 2014.

GUPTA, N.; KUPFER, S. S.; DAVIS, A. M. Colorectal Cancer Screening. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, 28 maio. 2019.

HAYAMA, T. et al. G12V and G12C mutations in the gene KRAS are associated with a poorer prognosis in primary colorectal cancer. **International Journal of Colorectal Disease**, v. 34, n. 8, p. 1491–1496, 1 ago. 2019.

HERMAN, P. et al. Surgical margin size in hepatic resections for colorectal metastasis: impact on recurrence and survival. **ABCD Arq Bras Cir Dig**. v. 26, n. 4: p.309-314, 2013.

HOSAIN, S. B. et al. Inhibition of glucosylceramide synthase eliminates the oncogenic function of p53 R273H mutant in the epithelial-mesenchymal transition and induced pluripotency of colon cancer cells. **Oncotarget**, v. 7, n. 37, p. 60575–60592, 13 set. 2016.

HUANG, R. et al. Dual role of reactive oxygen species and their application in cancer therapyJournal of Cancer. **Ivyspring International Publisher**, 2021.

HUMPTON, T. J. et al. p53-mediated adaptation to serine starvation is retained by a common tumour-derived mutant. **Cancer & Metabolism**, v. 6, n. 1, dez. 2018.

IGARASHI, T. et al. Significance of RAS mutations in pulmonary metastases of patients with colorectal cancer. **International Journal of Clinical Oncology**, v. 25, n. 4, p. 641–650, 1 abr. 2020.

INCA. Câncer de intestino. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-intestino>. Acesso em nov. 2021.

INCA. Neoplasia maligna do cólon e reto (taxas ajustadas). Disponível em: <https://www.inca.gov.br/estimativa/taxas-ajustadas/neoplasia-maligna-do-colon-e-reto>. Acesso em nov. 2021.

INCA. Estatísticas do câncer. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>. Acesso em nov. 2021.

Instituto Vencer o Câncer. Câncer de cólon e de reto. Disponível em: <https://vencerocancer.org.br/tipos-de-cancer/cancer-de-colon-e-de-reto/cancer-colorretal-tratamento/>. Acesso em ago. 2021.

IRAHARA, N. et al. NRAS mutations are rare in colorectal cancer. **Diagnostic Molecular Pathology**, v. 19, n. 3, p. 157–163, set. 2010.

JACOBSON, R. A. et al. **Evolving clinical utility of liquid biopsy in gastrointestinal cancersCancers**MDPI AG, , 1 ago. 2019.

JOERGER, A. C.; FERSHT, A. R. The p53 Pathway: Origins, Inactivation in Cancer, and Emerging Therapeutic Approaches. **Annual Review of Biochemistry**, v. 85, p. 375–404, 2 jun. 2016.

JONES, J. C. et al. JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY Non-V600 BRAF Mutations Define a Clinically Distinct Molecular Subtype of Metastatic Colorectal Cancer. 2017.

KELLEY, M; FISHEL, M. DNA Repair in Cancer Therapy. **Molecular Targets and Clinical Applications.** 2nd Edition, Jun. 2016.

KHROMOVA, N, V. et al. p53 hot-spot mutants increase tumor vascularization via ROS-mediated activation of the HIF1/VEGF-A pathway. **Cancer Letters**, v. 276, n. 2, p. 143–151, 2009.

KIDESS-SIGAL, E. et al. Enumeration and targeted analysis of KRAS, BRAF and PIK3CA mutations in CTCs captured by a label-free platform: Comparison to ctDNA and tissue in metastatic colorectal cancer. **Oncotarget**, v. 7, n. 51, p. 85349–85364, 20 dez. 2016.

KIM, J. H. et al. Genomically complex human angiosarcoma and canine hemangiosarcoma establish convergent angiogenic transcriptional programs driven by novel gene fusions. **Molecular Cancer Research**, v. 19, n. 5, p. 847–861, 1 maio 2021.

KIM, M. P.; LOZANO, G. Mutant p53 partners in crime. **Cell Death and Differentiation**, v. 25, n. 1, p. 161–168, 2018.

KUIPERS, E. J. et al. Colorectal cancer. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 1, 5 nov. 2015.

LANGE, M.; BEGOLLI, R.; GIAKOUNTIS, A. Non-coding variants in cancer: Mechanistic insights and clinical potential for personalized medicine. **Noncoding RNA,** v. 7, n.3, sep. 2021.

LEAL, L, F. et al. Mutational profile of Brazilian lung adenocarcinoma unveils association of EGFR mutations with high Asian ancestry and independent prognostic role of KRAS mutations. **Nature Scientific Reports**, v. 9, 3209, 2019.

LEE, S, Y. et al. A new approach of digital PCR system for non-invasive prenatal screening of trisomy 21. Clinica Chimica Acta, v. 476, p. 75-80, 2018.

LEICHSENRING, J. et al. Synonymous EGFR variant p.Q787Q is neither prognostic nor predictive in patients with lung adenocarcinoma. **Genes, Chromosomes and Cancer**. 17 Oct. 2016.

LEPRE, M. G. et al. Insights into the effect of the G245S single point mutation on the structure of p53 and the binding of the protein to DNA. **Molecules**, v. 22, n. 8, 1 ago. 2017.

LI, L. et al. Serum Chemokine CXCL7 as a Diagnostic Biomarker for Colorectal Cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 9, 9 out. 2019.

LIMA, J, M. et al. Estudo do polimorfismo genético no gene p53 (Códon 72) em câncer colorretal. **Arq Gastroenterol – FAPESP**, v.43 (1), 2006.

LIN, C. et al. Liquid Biopsy, ctDNA Diagnosis through NGS. **Life (Basel)**, v. 11, n.9, set. 2021.

LIU, L. et al. The cell cycle in stem cell proliferation, pluripotency and differentiation. **Nature Cell Biology,** 1 set. 2019.

LU, T.; LI, J. Clinical applications of urinary cell-free DNA in cancer: current insights and promising future. **Am J Cancer Res**, v. 7, n. 11, p. 2318–2332. 2017.

MAITI, G. P. et al. Overexpression of EGFR in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Is Associated with Inactivation of SH3GL2 and CDC25A Genes. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, 10 maio 2013.

MALEKZADEH, P. et al. Neoantigen screening identifies broad TP53 mutant immunogenicity in patients with epithelial cancers. **Journal of Clinical Investigation**, v. 129, n. 3, p. 1109–1114, 1 mar. 2019.

MALLMANN, G. et al. Câncer colorretal. 2017.

MAMLOUK, S. et al. Malignant transformation and genetic alterations are uncoupled in early colorectal cancer progression. **BMC Biology**, v. 18, n. 1, 7 set. 2020.

MANOHARAN, V. et al. Pattern of nucleotide variants of TP53 and their correlation with the expression of p53 and its downstream proteins in a Sri Lankan cohort of breast and colorectal cancer patients. **BMC Cancer**, v. 20, n. 1, 30 jan. 2020.

MAO, X. et al. Novel multi-targeted ErbB family inhibitor afatinib blocks EGF-induced signaling and induces apoptosis in neuroblastoma. **Oncotarget**, v. 8, n. 1, 3 jan. 2017.

MCFALL, T.; STITES, E. C. A mechanism for the response of KRASG13D expressing colorectal cancers to EGFR inhibitors. **Molecular and Cellular Oncology**, v. 7, n. 2, 3 mar. 2020.

MCMURRAY, H. R. et al. Synergistic response to oncogenic mutations defines gene class critical to cancer phenotype. **Nature**, v. 453, n. 7198, p. 1112–1116, 19 jun. 2008.

MEI, L. et al. Ataxia telangiectasia and Rad3-related inhibitors and cancer therapy: Where we stand. **Journal of Hematology and Oncology,** BioMed Central Ltd., 24 abr. 2019.

MENG, L. QIN. Essential role of polymorphism of Gab1, EGFR, and EGF for the susceptibility of biliary tract cancer. **Tumor Biology**, v. 35, n. 12, p. 12497–12508, 1 dez. 2014.

MESSEHA, S, S. et al. A Rare Presentation of a Non-Asian Female With Metastatic Non-small-cell Lung Cancer Harboring EGFR L747P Mutation With Clinical Response to Multi-targeted Epigenetic and EGFR Inhibition. **Anticancer Research January,** 42 (1), p. 441-447, 2022.

MILLER, S, A; DYKES D, D; POLESKY, H, F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Res.** 16(3): 1215, 1988.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Protocolos Clínicos e Diretrizes Terapêuticas em Oncologia. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/protocolos_clinicos_diretrizes_terapeuticas_oncologia.pdf>. Acesso em set. 2021.

MOJTABANEZHAD SHARIATPANAHI, A. et al. Simple and cost-effective laboratory methods to evaluate and validate cell-free DNA isolation. **BMC Research Notes**, v. 11, n. 1, 23 out. 2018.

MOLINA-ARCAS, M.; SAMANI, A.; DOWNWARD, J. **Drugging the undruggable: Advances on RAS targeting in cancerGenes**MDPI AG, 1 jun. 2021.

NAKAMURA, M. et al. Randomized phase II study of cetuximab versus irinotecan and cetuximab in patients with chemo-refractory KRAS codon G13D metastatic colorectal cancer (G13D-study). **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 79, n. 1, p. 29–36, 1 jan. 2017.

NIH. Mutação germinativa. **Instituto Nacional de Saúde.** Disponível em: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/germline-mutation>. Acesso em nov. 2021.

NIH. Mutação somática. **Instituto Nacional de Saúde.** Disponível em: <https://www.cancer.gov/search/results?swKeyword=Somatic+mutation>. Acesso em nov. 2021.

NORMANNO, N. et al. The liquid biopsy in the management of colorectal cancer patients: Current applications and future scenarios. **Cancer Treatment Reviews**, 70 , p. 1-8, 2018.

OLIVEIRA, A. de A; NETO, F. H. C. Anatomia e Fisiologia: a incrível máquina do corpo humano. 2 ed. Fortaleza, 2015.

OLIVEIRA, I. B. D.; HIRATA, R. D. C. Circulating cell-free DNA as a biomarker in the diagnosis and prognosis of colorectal cancer Brazilian. **Journal of Pharmaceutical Sciences,** 2018.

OLSZEWSKI, M. B. et al. Diverse and cancer type-specific roles of the p53 R248Q gain-of-function mutation in cancer migration and invasiveness. **International Journal of Oncology**, v. 54, n. 4, p. 1168–1182, 1 abr. 2019.

OSUMI, H. et al. Clinical utility of circulating tumor DNA for colorectal cancer. **Cancer Science Black**, 1 abr. 2019.

PANG, Y. et al. Diabetes, plasma glucose and incidence of colorectal cancer in Chinese adults: A prospective study of 0.5 million people. **Journal of Epidemiology and Community Health**, v. 72, n. 10, p. 919–925, 1 out. 2018.

PARK, M, K. et al. Alu cell-free DNA concentration, Alu index, and LINE-1 hypomethylation as a cancer predictor. **Clinical Biochemistry**, v. 94, p. 67-73, ago. 2021.

PARREIRAS, F. C. et al. Genetic aspects of colorectal cancer and its impact on disease management. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 23, n. 2, 2013.

PATEL, A. Benign vs Malignant Tumors. **JAMA Oncology**American Medical Association, 1 set. 2020.

PLUMMER, J. M. et al. Surgical quality in colorectal cancer. **Annals of Medicine and Surgery**, v. 5, p. 52–56, 1 fev. 2016.

QIN, Z. et al. Cell-free circulating tumor DNA in cancer Chinese Journal of Cancer. **Landes Bioscience,** 1 maio 2016.

RIBEIRO, J, U; RIBEIRO, A, V, S. P53 na prática clínica - Sim ou não? **Arq Gastroenterol**, v. 43(1): p. 6-7, 2006.

RAEVSKIY, M. et al. EGFR Pathway-Based Gene Signatures of Druggable Gene Mutations in Melanoma, Breast, Lung, and Thyroid Cancers. **Biochemistry (Moscow)** v. 86, p. 1477–1488, 2021.

ROCHA, J, J, R. Coloproctologia. Princípios e Práticas. 2 Ed. São Paulo: **Editora Atheneu**, 2011.

ROSSI, M. et al. Colorectal cancer and alcohol consumption—populations to molecules. **Cancers**, v. 10, n. 2, 1 fev. 2018.

SAINI, A. et al. Liquid Biopsy in Gastrointestinal Cancers. **Diagnostics**, v. 8, n. 4, p. 75, 29 out. 2018.

SANCHEZ-IBARRA, H. E. et al. KRAS, NRAS, and BRAF mutation prevalence, clinicopathological association, and their application in a predictive model in Mexican patients with metastatic colorectal cancer: A retrospective cohort study. **PLoS ONE**, v. 15, n. 7, 1 jul. 2020.

SAWICKI, T. et al. A review of colorectal cancer in terms of epidemiology, risk factors, development, symptoms and diagnosis. **Cancers**, 1 maio 2021.

SCHØLER, L. V. et al. Clinical implications of monitoring circulating Tumor DNA in patients with colorectal cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 23, n. 18, p. 5437–5445, 15 set. 2017.

SEGELOV, E. et al. ICECREAM: Randomised phase II study of cetuximab alone or in combination with irinotecan in patients with metastatic colorectal cancer with either KRAS, NRAS, BRAF and PI3KCA wild type, or G13D mutated tumours. **BMC Cancer**, v. 16, n. 1, 31 maio 2016.

SHAJANI-YI, Z. et al. Frequency of Somatic TP53 Mutations in Combination with Known Pathogenic Mutations in Colon Adenocarcinoma, Non–Small Cell Lung Carcinoma, and Gliomas as Identified by Next-Generation Sequencing. **Neoplasia (United States)**, v. 20, n. 3, p. 256–262, 1 mar. 2018.

SHARMA, S. V. et al. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. **Nature Reviews Cancer**, mar. 2007.

SIMON, K. Colorectal cancer development and advances in screening. **Clinical Interventions in Aging,** p. 967–976, 19 jul. 2016.

SINHA, R. et al. Kras Gene Mutation and RASSF1A, FHIT and MGMT Gene Promoter Hypermethylation: Indicators of Tumor Staging and Metastasis in Adenocarcinomatous Sporadic Colorectal Cancer in Indian Population. **PLoS One**, v. 8, n. 4, 2013.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CANCEROLOGIA. Câncer de reto: tratamento quimioterápico. Disponível em: <https://amb.org.br/files/ans/cancer_de_reto-tratamento_quimioterapico.pdf>. Acesso em ago. 2021.

STARK, A. et al. High-throughput sample processing for methylation analysis in an automated, enclosed environment. **SLAS Technology**, dez. 2021.

SUNG, Y. E.; CHO, U.; LEE, K. Y. Peripheral type squamous cell carcinoma of the lung: Clinicopathologic characteristics in comparison to the central type. **Journal of Pathology and Translational Medicine**, v. 54, n. 4, p. 290–299, 1 jul. 2020.

SYMONDS, E. L. et al. Circulating tumour DNA for monitoring colorectal cancer-a prospective cohort study to assess relationship to tissue methylation, cancer characteristics and surgical resection. **Clinical Epigenetics**, v. 10, n. 1, 16 maio 2018.

TALWAR, P. et al. Validating a Genomic Convergence and Network Analysis Approach Using Association Analysis of Identified Candidate Genes in Alzheimer's Disease. **Frontiers in Genetics**, v. 12, 9 dez. 2021.

VATANSEVER, S.; ERMAN, B.; GÜMÜŞ, Z. H. Oncogenic G12D mutation alters local conformations and dynamics of K-Ras. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 1 dez. 2019.

VERMEULEN, L. et al. Defining stem cell dynamics in models of intestinal tumor initiation. **Science**, v. 342, n. 6161, p. 995–998, 2013.

VERY, N.; LEFEBVRE, T.; EL YAZIDI-BELKOURA, I. Drug resistance related to aberrant glycosylation in colorectal cancer. **Oncotarget**, v. 9, n. 1, p. 1380–1402, 2 jan. 2018.

WAN, J, C, M. et al. Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA. **Nature Reviews Cancer.** v. 17, p 223–238, 2017.

WEE, P.; WANG, Z. Epidermal growth factor receptor cell proliferation signaling pathways. **Cancers**, 17 maio 2017.

WIEDUWILT, M. J.; MOASSER, M. M. The epidermal growth factor receptor family: Biology driving targeted therapeutics. **Cellular and Molecular Life Sciences**, maio 2011.

WONG, M. C. S. et al. Differences in Incidence and Mortality Trends of Colorectal Cancer Worldwide Based on Sex, Age, and Anatomic Location. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 19, n. 5, p. 955- 966.e61, 1 maio 2021.

XIAO, D. et al. High tumor mutation burden and dna repair gene mutations are associated with primary resistance to crizotinib in alk-rearranged lung cancer. **OncoTargets and Therapy**, v. 14, p. 4809–4817, 2021.

YAMADA, T. et al. Liquid Biopsy for the Management of Patients with Colorectal Cancer. **Digestion**. v 99, p. 39-45, 2018.

YU, R. T. D.; GARCIA, R. L. NRAS mutant E132K identified in young-onset sporadic colorectal cancer and the canonical mutants G12D and Q61K affect distinct oncogenic phenotypes. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 1 dez. 2020.

YUAN, Y. et al. Clinical characteristics and prognostic value of the KRAS mutation in Chinese colorectal cancer patients. **International Journal of Biological Markers**, v. 36, n. 2, p. 33–39, 2021.

ZHANG, Y. et al. Cholecystectomy can increase the risk of colorectal cancer: A meta-analysis of 10 cohort studies. **PLoS ONE**, v. 12, n. 8, 1 ago. 2017.

ZHOU, Y. et al. Blockade of the Phagocytic Receptor MerTK on Tumor-Associated Macrophages Enhances P2X7R-Dependent STING Activation by Tumor-Derived cGAMP. **Immunity**, v. 52, n. 2, fev. 2020.