



**UNB**

**Universidade de Brasília**  
**Faculdade de Ciências da Saúde**

**FLÁVIO DE ALENCAR TELES BARRETO**

Análise de Alterações Moleculares em Tumores de Cólon e Reto  
para Utilização como Biomarcadores para Detecção por Biópsia  
Líquida

Brasília, 2025

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**FLÁVIO DE ALENCAR TELES BARRETO**

ANÁLISE DE ALTERAÇÕES MOLECULARES EM TUMORES DE  
CÓLON E RETO PARA UTILIZAÇÃO COMO BIOMARCADORES  
PARA DETECÇÃO POR BIÓPSIA LÍQUIDA

Dissertação apresentada como requisito  
parcial para a obtenção do Título de  
Mestre em Ciências Médicas pelo  
Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Médicas da Universidade de  
Brasília

Orientador: Prof. Dr. Fábio Pittella Silva

Brasília

2025

**FLÁVIO DE ALENCAR TELES BARRETO**

**ANÁLISE DE ALTERAÇÕES MOLECULARES EM TUMORES DE  
CÓLON E RETO PARA UTILIZAÇÃO COMO BIOMARCADORES  
PARA DETECÇÃO POR BIÓPSIA LÍQUIDA**

Dissertação apresentada como requisito  
parcial para a obtenção do Título de  
Mestre em Ciências da Saúde pelo  
Programa de Pós-Graduação em  
Ciências da Saúde da Universidade de  
Brasília

Aprovado em

Banca Examinadora

Prof. Dr. Fábio Pittella Silva (Presidente)

Universidade de Brasília

Prof. Dra. Julian Mazzeu

Universidade de Brasília

Prof. Dr. Diêgo Madureira de Oliveira

Universidade de Brasília

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA PROGRAMA DE PÓS-  
GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS FACULDADE DE  
CIÊNCIAS DA SAÚDE

Flávio de Alencar Teles Barreto

Análise de Alterações Moleculares Presentes em Tumores de Cólon  
e Reto para Utilização como Biomarcadores para Detecção por  
Biópsia Líquida

## AGRADECIMENTOS

Aproveito este espaço para dedicar essa vitória às pessoas que forneceram suporte físico e emocional para a realização deste trabalho, sem elas, eu não teria chegado tão longe. Apesar da minha dedicação, saber que existem pessoas ao meu redor, que me apoiaram e ajudaram com tanto carinho e acolhimento, foi essencial para concluir essa jornada tão árdua, porém gratificante, com êxito, desempenho e, principalmente, alegria e realização pessoal e profissional.

Gostaria de agradecer primeiramente, aos meus pais **Maria Letícia** e **Luiz Paulo**, por terem dedicado 32 anos na formação do homem, cidadão, marido e pai que me tornei. Por trás de tantos ensinamentos, sem dúvida alguma, o amor incondicional deles foi o que mais marcou a minha trajetória de vida. Apesar das minhas dificuldades, eles nunca duvidaram da minha capacidade, e é com imensa gratidão que dedico todas as minhas conquistas a vocês.

À minha parceira de profissão e de vida, **Mariana**, exemplo de mulher, esposa e mãe. Agradeço pelo apoio e amor que sempre ofereceu. Sem seu apoio, eu jamais teria alcançado meus sonhos e objetivos, com isso, essa conquista também se estende a você.

Com um agradecimento especial aos meus filhos **Miguel** e **João**, pelo amor e companheirismo incondicional, agradeço a todo o apoio, pois apenas o fato da existência de vocês, me faz ser uma pessoa e profissional cada vez melhor, repleto de otimismo, persistência, resiliência e dedicação que tanto busco para garantir uma vida digna a vocês, e que eu possa servir de exemplo de vida.

Ao professor **Fábio**, por ser um exemplo de pessoa, e orientador, ao qual tive a honra de aprender como um pesquisador deve ser. Agradeço a oportunidade de poder provar o meu valor e mostrar que sou capaz de integrar e agregar valor e conhecimento, ao grupo de pesquisadores excepcionais que compõem o Câncer Lab.

Aos meus queridos colegas, colaboradores e amigos que nunca pouparam esforços para me ajudar em trabalhos de bancada, escrita, e principalmente, no apoio emocional que nunca me faltou. Agradeço também, a todos os cafés feitos após minhas 12 horas de plantão. A presença de vocês permitiu que esse caminho, por mais difícil que tenha sido, fosse repleto de acolhimento, parceria e, principalmente felicidades. Aos meus colegas **Ana, Mariana, Brunna, Luis, Mayra, André, Lara, Ekaly, Sofia, Sophia** e a todos os alunos e colegas que ajudaram de alguma forma para a construção deste trabalho.

Gostaria de agradecer também a uma pessoa em especial, minha professora da graduação e primeira orientadora de pesquisa científica, **Fernanda Vinhaes**, que me ensinou que o biomédico é, por essência, um pesquisador. O incentivo dessa frase me marcou e me acompanhou durante toda minha trajetória acadêmica e profissional e, com certeza, foi a ideia que me fez ingressar no universo da pesquisa.

Por fim, quero agradecer à banca pela disponibilidade e contribuição para realização desse trabalho. Agradeço também ao Programa de Pós-graduação de Ciências Médicas da Universidade de Brasília e aos órgãos de fomento, FAPDF e CNPq pela realização deste trabalho.

## RESUMO

O câncer colorretal (CCR) é uma das neoplasias malignas de maior incidência e letalidade no mundo, caracterizando-se por sua elevada heterogeneidade genética e clínica. Este estudo teve como objetivo caracterizar o perfil mutacional de pacientes com CCR por meio do sequenciamento de Nova Geração (NGS), empregando amostras frescas e congeladas para garantir a qualidade e a integridade do material genético. Foi realizada a padronização dos processos de coleta, armazenamento e análise, possibilitando a identificação confiável dos principais genes com mutações somáticas na população estudada.

Foram destacadas mutações recorrentes nos genes APC, KRAS, TP53, DHFR, MSH3 e NQO1, os quais estão envolvidos em vias cruciais de carcinogênese, como proliferação celular, reparo do DNA, apoptose, estresse oxidativo e resistência a fármacos. A análise de coocorrência revelou interações relevantes entre esses genes, sugerindo sinergias moleculares que podem agravar o prognóstico. Além disso, foi observada correlação significativa entre a expressão positiva de NQO1 e uma maior carga mutacional tumoral (TMB), bem como entre o grau de diferenciação celular e o Variant Allele Frequency (VAF), evidenciando possíveis biomarcadores prognósticos e preditivos.

Os achados reforçam a necessidade de traçar um perfil genético do CCR em populações brasileiras, dada a influência de fatores ambientais e genéticos na frequência e no tipo de mutações. Os dados obtidos contribuem para o entendimento da biologia tumoral local e para a consolidação de estratégias em medicina personalizada.

**Palavras-chave:** Neoplasias Colorretais; Perfil da Expressão Gênica; Sequenciamento de Nova Geração; Biomarcadores Tumoriais; Patologia Molecular.

## ABSTRACT

Colorectal cancer (CRC) is one of the most prevalent and lethal malignant neoplasms worldwide, marked by considerable genetic and clinical heterogeneity. This study aimed to characterize the mutational profile of CRC patients using Next-Generation Sequencing (NGS), employing fresh-frozen samples to ensure high-quality genomic material and reliable analyses. Standardized protocols for sample collection, storage, and processing enabled the accurate identification of somatic gene mutations within the studied population.

Notably, frequent mutations were observed in the *APC*, *KRAS*, *TP53*, *DHFR*, *MSH3*, and *NQO1* genes — all implicated in key oncogenic pathways such as cell proliferation, apoptosis, DNA repair, oxidative stress response, and chemoresistance. Co-occurrence analysis revealed significant interactions between these genes, suggesting synergistic effects that may amplify carcinogenic signaling and contribute to worse prognoses. Furthermore, a statistically significant correlation was identified between *NQO1* expression and higher tumor mutational burden (TMB), as well as between tumor differentiation grade and variant allele frequency (VAF), highlighting potential predictive and prognostic biomarkers.

These findings emphasize the importance of establishing a population-specific genetic profile for CRC in Brazil, where somatic alterations are strongly influenced by environmental and lifestyle factors, in addition to genetic predisposition. The data presented provide insights into the molecular biology of CRC within the local population and support the advancement of precision oncology initiatives.

**Keywords:** colorectal Neoplasm; Gene Expression Profiling; Next-Generation Sequencing; Tumor biomarkers; Molecular pathology.

## **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1 – Incidência de casos de câncer colorretal no Brasil

Figura 2 – Modelo Multi-Hit de progressão da carcinogênese do câncer colorretal.

Figura 3 – Fluxograma de coleta de amostra

Figura 4 – Local de coleta dos fragmentos tumorais. Cólon com evidência na musculatura Lisa

Figura 5- Distribuição de localização tumoral (segmento) entre os pacientes do sexo feminino e masculino.

Figura 6 – Caracterização tumoral por estadiamento clínico e volume tumoral

Figura 7 – Análise de distribuição do marcador antígeno embrionário, volume tumoral, mutações e TMB

Figura 8 – Distribuição dos pacientes do estudo com a quantidade de mutações presentes entre eles.

Figura 9 – Heatmap da análise de genes e mutações por paciente, evidenciando os principais genes e os respectivos pacientes com suas mutações

Figura 10 – Os 10 principais genes presentes e a quantidade de pacientes com pelo menos 2 mutações por gene

Figura 11 – Os 10 principais genes presentes e a quantidade de pacientes com pelo menos 2 mutações por gene

Figura 12 –: Tipos de mutações encontradas entre os 194 genes

Figura 13 – Heatmap com os 20 principais genes mutados

Figura 14 – Sankeyplot das alterações de APC

Figura 15- Genes classificados como patogênicos através banco de dados ClinVar inserido na plataforma OCA Plus

Figura 16- Análise de distribuição do marcador antígeno embrionário (CEA), número de mutações e carga tumoral.

Figura 17- Associação de valores dicotomizados de CEA e TMB

Figura 18- Heatmap com os 20 genes mais mutados e suas respectivas co-ocorrência

Figura 19- Associação de teste exato de Fisher entre amostras dicotomizadas de APC e TP53

Figura 20- Correlação entre níveis de CEA com frequência alélica de APC,

Figura 21- Análise de correlação entre o gene KRAS com dados clínicos e genéticos

Figura 22- Gráfico de correlação de pacientes com mutações nos genes DHFR,MSH3 e a carga tumoral TMB.

Figura 23- Análise de correlação entre VAF de TP53 com dados clínicos

Figura 24- Análise de correlação entre pacientes com CEA e Volume tumoral

## **LISTA DE TABELA**

Tabela 1 – Análise descritiva de caracterização clínica das variáveis dos pacientes

Tabela 2 – Relação do volume tumoral com a obstrução intestinal em pacientes com CEA elevado

Tabela 3 – Principais mutações em coorte de 1.948 amostras de cólon e 1.060 de reto inseridas no portal cBIO

## **ABREVIATURAS**

CCR- Câncer Colorretal

NCI- National Cancer Institute

OMS- Organização Mundial da Saúde

PAF- Polipose Adenomatosa Familiar

MSI- Instabilidade de Microsatélite

MSI-H- Alta Instabilidade de Microsatélite

ICI- Inibidor de Checkpoint Imunológico

CMS- Consensus Molecular Subtypes

CIMP- Metilação em sítio CpG

EMT- Transição Epitélio Mesenquimal

NGS- Sequenciamento de Nova Geração

cfDNA- DNA Circulante Tumoral

SNV- Single Nucleotide Variants

INDEL- Inserção e Deleção

MNV- Multinucleotide Variants

VAF- Variant Allele Frequency

TMB- Tumor Mutation Burden

INCA- Instituto Nacional do Câncer

HAS- Hipertensão Arterial Sistêmica

AJCC- American Joint Committee on Cancer

CEA- Antígeno Carcinoembrionário

GTP- Guanosina Trifosfato

WT- Wild Type

IMC- Índice de Massa Corporal

## **SUMÁRIO**

### **1. INTRODUÇÃO**

- 1.1 O CÂNCER COLORRETAL
- 1.2 CARACTERÍSTICAS HEREDITÁRIAS E SOMÁTICAS
- 1.3 CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR
  - 1.3.1 CONSENSO DE SUBTIPOS MOLECULARES (CMS)
  - 1.3.2 PRINCIPAIS VIAS DE SINALIZAÇÃO
  - 1.3.3 WNT/ $\beta$ -CATENINA
  - 1.3.4 MAPK
  - 1.3.5 PI3K/AKT/MTOR
- 1.4 PAINEL GENÉTICO

### **2. Objetivos**

- 2.1 OBJETIVOS GERAIS
- 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

### **3. MÉTODOS**

- 3.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DOS TECIDOS TUMORAIS
- 3.2 FLUXOGRAMA
- 3.3 ISOLAMENTO DE DNA E RNA
- 3.4 ONCOMINE COMPREHENSIVE ASSAY PLUS (OCA PLUS)
- 3.6 PREPARO DE BIBLIOTECA GENÔMICA E ANÁLISE DE DADOS DE NGS
- 3.7 CHAMADA DE VARIANTES
- 3.8 PERFIL MOLECULAR E ANÁLISE ESTATÍSTICA

### **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### 4.1 PERFIL CLÍNICO

#### 4.2- CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

#### 4.3 QUALIDADE DE DNA/RNA OBTIDOS

#### 4.4 GENES MUTADOS

#### 4.5 MUTAÇÕES

#### 4.6 CLASSIFICAÇÃO DAS MUTAÇÕES

##### 4.6.1 GENES PATOGÊNICOS

##### 4.6.2 FREQUÊNCIA DE APARECIMENTO

##### 4.6.3 MUTAÇÕES COCORRENTES

##### TMB E FREQUENCIA ALÉLICA TOTAL

##### FREQUENCIA ALÉLICA DOS GENES PATOGENICOS VS CEA

#### 4.7 ANALISE DE BANCO DE DADOS PUBLICO

#### 4.8 CORRELAÇÃO CLÍNICA

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.2 O CÂNCER COLORRETAL

O câncer colorretal (CCR) é o terceiro câncer mais incidente no mundo, alcançando 1,9 milhões de novos casos em 2020 e com índice de mortalidade superior a 900 mil mortes anualmente (1). De acordo com o National Cancer Institute (NCI), estima-se mais de 154 mil novos casos em 2025 com 52.900 mil óbitos, média de idade de 66 anos no momento do diagnóstico, e maior predomínio em indivíduos do sexo masculino (2) . A Organização Mundial de Saúde (OMS) presume que, até o ano de 2040, a incidência de câncer colorretal poderá alcançar 3,2 milhões de novos casos anuais, acompanhada de um aumento estimado de 73% na mortalidade, evidenciando a necessidade de investigação aprofundada em mecanismos de progressão desta doença (1).

No Brasil, o CCR é considerado uma questão de saúde pública sendo o segundo tipo de câncer mais prevalente no país, com uma taxa de incidência de 21,19 casos a cada 100.000 habitantes e com alto índice de mortalidade, sendo superado apenas pelo câncer de pulmão. Estima-se que até o final de 2025, haverá um aumento considerável de casos de CCR, principalmente entre mulheres (Figura 1) (3).

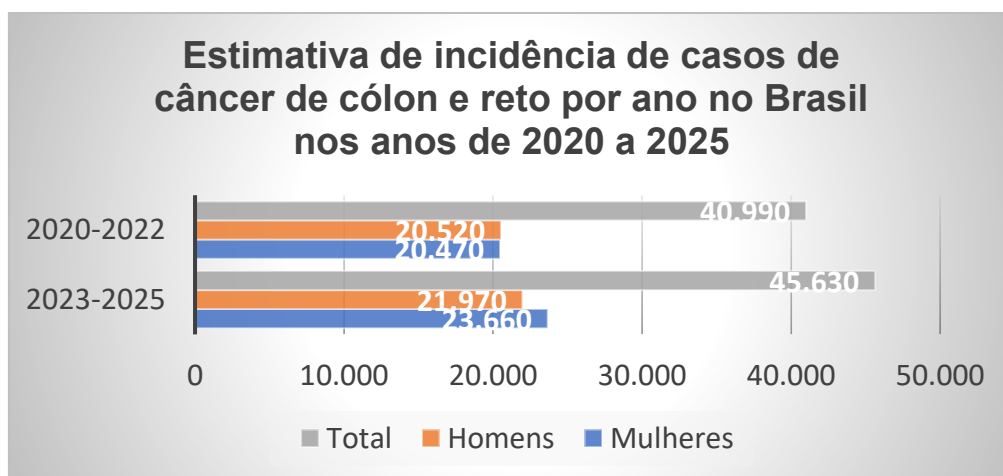


Figura 1: Estimativa de incidência de casos de câncer colorretal no Brasil. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). Estimativa 2023 Incidência de câncer no Brasil.

Diante desse cenário desafiador, torna-se essencial aprofundar a compreensão sobre os mecanismos envolvidos na gênese e progressão do CCR, especialmente através da caracterização de assinaturas genéticas associadas à doença. Através da análise molecular, é possível identificar o padrão de identidade genética deixada por diferentes tipos de neoplasias, e estabelecer genes candidatos à biomarcadores de adenocarcinoma de cólon e reto.

Segundo Fearon e Volgenstein (1990), a carcinogênese do CCR caracteriza-se pela proliferação descontrolada da mucosa intestinal, evidenciada pelo surgimento de pólipos. Estes pólipos, à nível molecular, a ativação de mutações inativando genes supressores tumorais como KRAS, TP53, DDC e, particularmente o gene APC (Chr5), intensificando assim, o crescimento dessas estruturas (4). Além disso, este fator está associado ao destaque levantado por Bodmer et al, sobre a relação entre o gene APC em casos hereditários e esporádicos da doença, bem como a perda da heterozigosidade nessa região do cromossomo, facilitando a progressão do tumor (5).

O modelo Multi-Hit propõe que a tumorigênese se inicia através do epitélio normal com perda de atividade de genes de supressão tumoral como APC. Através de 10 anos de progressão, há a ativação de oncogenes como o KRAS e desativação de genes de supressor tumoral TP53 e DCC (6) Figura 2.

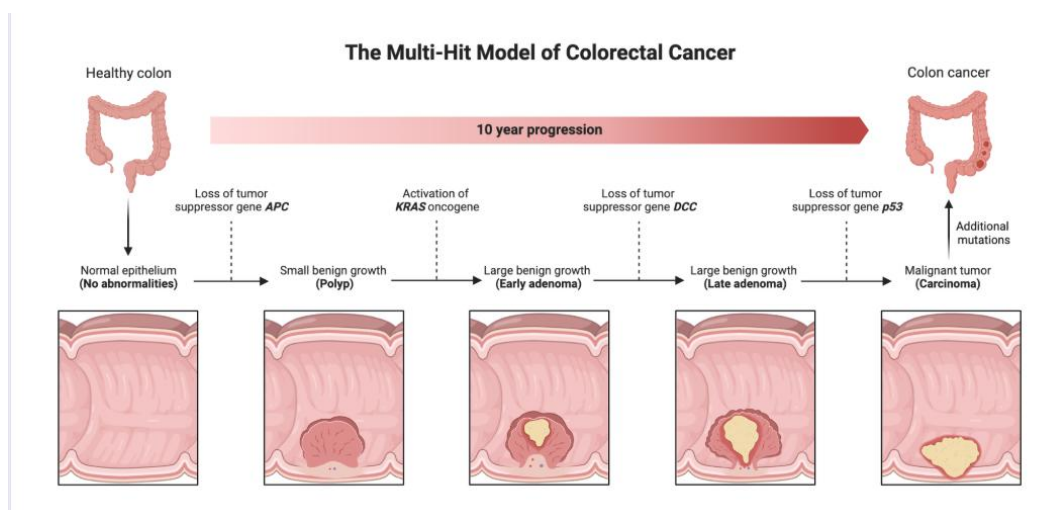


Figura 2: Modelo Multi-Hit de progressão da carcinogênese do câncer colorretal. Biology: A Global Approach, 2018.

Outros estudos exploram a progressão de mutações somáticas frequentemente encontradas em pacientes com CCR como o BRAF, KRAS, NRAS, PIK3CA, TP53. Entre eles, genes que atuam em vias de sinalização diretamente relacionadas à neoplasias, como Wnt, MAPK e TGF- $\beta$ . (7,8). Outro estudo analisou 2.023 amostras de CCR através do sequenciamento do genoma inteiro. Nele, um perfil de mutações foi encontrado em genes como APC, PTEN, SMAD4 e SOX9, além de alterações envolvendo as enzimas quinases NTRK, BRAF, ALK e RET. (9)

### 1.3 CARACTERÍSTICAS HEREDITÁRIAS E SOMÁTICAS

O câncer colorretal pode ter origem hereditária sendo associado à Síndrome de Lynch e à Polipose Adenomatosa Familiar (PAF). Indivíduos com mutações no gene APC têm risco elevado de desenvolver a doença até os 50 anos, tornando essencial a realização de colonoscopia anual a partir dos 15 anos. Estudos epidemiológicos encontraram maior risco e pior prognóstico da doença em pacientes com parentesco próximos a diagnosticados com CCR, além de ter associações com outros tipos de neoplasias como tireoide e melanoma (10).

Em alguns casos, pacientes com PAF podem estar associados ao risco de desenvolvimento do câncer papilar de tireoide (<2%), câncer de pâncreas (<1%) e hepatoblastoma (1-2%). Entretanto, por se tratar de uma doença autossômica dominante, é estimado que os indivíduos com mutações hereditária no gene *APC*, possuem grandes chances de desenvolver CCR até os 50 anos, sendo, assim, recomendado a realização de colonoscopia anual a partir dos 15 anos (11,12).

As mutações somáticas compõem a maioria dos fatores de desenvolvimento de tumores de cólon e reto, influenciado pela ativação de vias de transdução de sinal no tecido e progressão do adenoma para carcinoma ao longo dos anos. Isso ocorre através da constante ativação ou inativação de vias reguladoras. O diagnóstico clínico só é possível após o aparecimento dos sintomas ou screening precoce. Nesses casos, as alterações moleculares já estão avançadas, e tendem a piorar a medida da progressão tumoral. Com isso, é possível realizar a detecção de alvos sub clínicos da doença através de detecção de alterações em estágios iniciais. Assim, mutações em genes como *TP53*, *APC* e *KRAS*,

desempenham um papel central na sinalização de vias indutoras à carcinogênese, e impactam diretamente no desenvolvimento tumoral (13).

A incidência de câncer colorretal tem aumentado, especialmente em pacientes com menos de 50 anos, representando cerca de 10% dos casos. Esse crescimento está associado a fatores como dieta ocidental, obesidade, sedentarismo e disbiose intestinal, que influenciam a progressão tumoral. Embora algumas ocorrências estejam ligadas a mutações hereditárias, a maioria dos casos é esporádica, sem causa identificável. Em geral, pacientes jovens apresentam sintomas por meses antes do diagnóstico, resultando em estágios mais avançados da doença e impacto na sobrevida (14). Além disso, o CCR com início precoce apresenta maior probabilidade de serem diagnosticados em estágios avançados (III ou IV) em comparação com indivíduos com início tardio da doença. Esse fenômeno está associado a diversos fatores, incluindo atraso no diagnóstico, menor frequência de rastreamento populacional e percepção inicial equivocada dos sintomas, muitas vezes atribuídos a condições benignas, como doenças gastrointestinais funcionais (15).

## 1.4 CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR

Ao longo dos anos, as mutações iniciais encontradas nos adenocarcinomas se acumulam e intensificam ainda mais a proliferação dos pólipos. O sistema de reparo de incompatibilidades do DNA (Mismatch Repair, MMR) é essencial para a manutenção da estabilidade genômica, corrigindo erros de pareamento de bases durante a replicação celular. A deficiência nesse mecanismo (dMMR) leva à instabilidade de microssatélites (MSI) devido a falta de eficiência em controlar as sequências repetidas das regiões MSI. Em alguns casos, o mecanismo dMMR pode falhar discriminadamente, levando a uma instabilidade de microssatélites alta (MSI-H), caracterizando um subtipo de câncer com alta carga mutacional e forte ativação imune. Tumores dMMR/MSI-H apresentam resposta robusta a inibidores de checkpoint imunológico (ICIs), como pembrolizumabe e nivolumabe, que demonstraram eficácia superior à quimioterapia convencional em pacientes com CCR metastático (16). Além disso, estudos indicam que a imunoterapia neoadjuvante pode evitar a necessidade de cirurgia em tumores dMMR localmente avançados, preservando

órgãos e melhorando a qualidade de vida dos pacientes. No entanto, uma parcela desses tumores desenvolve resistência primária ou adquirida aos ICIs, exigindo biomarcadores preditivos para otimizar estratégias terapêuticas. A compreensão dos mecanismos de resistência e a integração de novas abordagens, como terapias combinadas, são fundamentais para ampliar os benefícios da imunoterapia no CCR (17).

O acúmulo de mutações em genes como *KRAS*, *BRAF*, *NRAS* e *TP53* são frequentemente relatadas em análises de sequenciamento tumoral e em bancos de dados como COSMIC, TCGA, entre outros. Inclusive, variantes raras como o *KRAS* G12C ou *BRAF* V600E e novas variantes, como *NRAS* 102Q, são frequentemente encontradas (18).

Portanto, é crucial compreender os mecanismos de carcinogênese do CCR, que impactam diretamente nas vias de sinalização de sinal que, através de proteínas e enzimas quinases, regulam as transduções de sinais responsáveis por ativação e inativação de funções regulatórias dos tecidos corporais como crescimento e migração celular, desenvolvimento muscular, síntese de proteínas (Figura 3) . A regulação dessas vias é feita por proteínas geradas por genes de supressão tumoral como *APC*, *AXIN1* e *CTNNB1* que fazem parte da via canônica Wnt/  $\beta$ -catenina, e genes como *KRAS* e *PIK3CA*, envolvidas nas vias MAPK e PI3K-AKT. Baseado neste conhecimento, foi criado o sistema de classificação molecular para estratificação do CCR, o que ajuda a melhor entender a heterogeneidade biológica dos tumores colorretais.



proteínas metabólicas, tendo uma assinatura molecular única. Tumores nessa classificação possuem potencial resistência a terapias convencionais, acometendo 13% dos tipos. O **CMS4** destaca-se como o grupo mais distinto, devido sua classificação mesenquimal, e representa tumores altamente invasivos com ativação de TGF- $\beta$  e superexpressão de proteínas associadas à angiogênese e forte infiltração do estroma, sendo associado à pior sobrevida e resistência terapêutica, além de possuir perfil metastático elevado com possível resistência a quimioterapia. Representa 23% dos subgrupos moleculares (19–21).

Com isso, a classificação CMS4 é alvo de diversos estudos sobre os mecanismos de desenvolvimento desse subgrupo e a exploração das funções biológicas do CMS4, apesar de não estar totalmente consolidada, leva a abordagens para novos tratamentos através de potenciais biomarcadores (22).

Além das classificações individuais, 13% dos casos apresentam características mistas, refletindo a heterogeneidade intratumoral e a plasticidade fenotípica. A classificação CMS é essencial para a definição de estratégias terapêuticas personalizadas, permitindo uma melhor seleção de pacientes e identificação de alvos moleculares. Estudos futuros devem aprofundar a relação entre microambiente tumoral, resposta imune e progressão da doença, para aprimorar o uso clínico dessa classificação (20).

## 1.6 PRINCIPAIS VIAS DE SINALIZAÇÃO

O CCR é uma doença altamente heterogênea, impulsionada por múltiplas vias de sinalização que regulam mecanismos de proliferação celular, apoptose, metabolismo e regulação do microambiente intestinal. A progressão desse câncer envolve mutações em genes chave, que desregulam as cascatas de sinalizações essenciais para a homeostase celular. Entre as diversas vias de sinalização, algumas são constantemente relacionadas ao CCR devido ao padrão de genes drivers, com capacidade de mutação que leva a uma vantagem seletiva das células tumorais, aumentando a ativação das vias de progressão tumoral. Em conjunto, mutações em genes de escape que estão envolvidos na capacidade celular de evadir o reconhecimento do sistema imunológico, são

relacionados a perfis de resistência imunológica das células tumorais, evitando a resposta imune que normalmente eliminaria as células tumorais (23).

O CCR é classificado como subtipo familiar ou esporádico. Dentre essa estratificação, é notoriamente considerada que 35% dos casos de CCR possuem um componente familiar importante, ou seja, possuem algum parente de primeiro grau com o mesmo diagnóstico. Entre os casos familiares, a regulação dos oncogenes é realizada pela via de sinalização Wnt, regulando genes de reparo de DNA e supressão tumoral como o *APC* (24)

#### 1.6.1- WNT/ $\beta$ -CATENINA

A via Wnt/ $\beta$ -catenina é crucial para o desenvolvimento embrionário e a manutenção do intestino. Sua ativação impede a degradação da  $\beta$ -catenina, promovendo a transcrição de genes relacionados à proliferação. Mutações no gene *APC* desregulam esse controle, favorecendo o surgimento de tumores no câncer colorretal. A ativação variável da via influencia o grau de stemness, tornando-se um marcador funcional para células-tronco tumorais (CSCs) (25).

Vias alternativas da sinalização Wnt, como Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$  e Wnt/CTNND1, também influenciam a progressão do câncer. A Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$  regula processos como migração celular, adesão e polaridade epitelial, fundamentais para a organização do tecido e invasão tumoral. Já a via Wnt/CTNND1 atua por meio da catenina- $\delta 1$ , que estabiliza a  $\beta$ -catenina, modula a adesão celular e a interação entre as células tumorais, favorecendo características agressivas da doença (26). Terapias direcionadas que modulam E2A/ $\beta$ -catenina impactam genes pró-tumorais e a transição epitélio-mesenquimal (EMT), com o FOXM1 como alvo-chave na iniciação tumoral(27). *AXIN1* integra o complexo de destruição da  $\beta$ -catenina, regulando sua degradação e bloqueando a ativação nuclear da via Wnt. Além disso, *AXIN1* interage com vias como MAPK, mTOR e TGF- $\beta$ , influenciando o crescimento tumoral, diferenciação celular e resistência terapêutica no câncer colorretal (CCR) (28).

### 1.6.2 MAPK

A via MAPK é uma das mais importantes na proliferação celular regulada por receptores de fator de crescimento epitelial. A hiperexpressão desses receptores é normalmente encontrada em vários tipos de cânceres (29)

A via MAPK é ativada por fatores como EGF, IGF-1 e VEGF, promovendo proliferação celular e resistência à apoptose. A mutação BRAF V600E, comum no CCR serrilhado, ativa constantemente a cascata RAS/RAF/MEK/ERK, intensificando alterações epigenéticas e evasão imune. MAPK também interage com TGF- $\beta$ , contribuindo para EMT e maior agressividade tumoral. (30) (31).

### 1.6.3 PI3K/AKT/MTOR

A via PI3K/AKT/mTOR desempenha um papel central na sobrevivência celular, metabolismo e resistência terapêutica. A ativação de PI3K por receptores de tirosina quinase leva à fosforilação de *AKT*, que regula processos como crescimento celular e inibição do apoptose. A via mTOR controla a síntese de proteínas e proliferação celular, sendo frequentemente hiperativada no CCR. Mutações no *PIK3CA* e perda de *PTEN* contribuem para a ativação aberrante dessa cascata, favorecendo a progressão tumoral e resistência a terapias direcionadas. A interação dessas vias são cruciais para a plasticidade tumoral, permitindo que células cancerígenas adaptem seu metabolismo e proliferem em condições adversas. Estratégias terapêuticas visando inibidores de MEK, PI3K e mTor estão sendo exploradas para modular essas vias e melhorar o prognóstico dos pacientes com CCR.

## 1.7 PAINEL GENÉTICO

Para elaborar um perfil abrangente de mutações em uma amostra tumoral, é indispensável empregar um painel com sondas específicas direcionadas a diferentes genes. Estas sondas podem atuar como sinalizadores para promover a amplificação de regiões do DNA e RNA tumoral, criando uma biblioteca de amplicons de diversas amostras para identificar mutações por tecnologia de Sequenciamento de Nova Geração (NGS), permitindo assim a análise

multigênica e com capacidade de identificar variantes patogênicas individuais. (32).

Muitos estudos observam a presença de alterações similares em pacientes com CCR, como instabilidade de microssatélites, e mutações em *BRAF*, *MLH1*, *MSH2M* e *PMS2* na coorte nacional (33). Além disso, mutações no *KRAS* são constantemente encontrados nos brasileiros com CCR, principalmente as variantes *KRAS* G12D/G12V. Mutações nos genes *APC*, *TP53*, *PIK3CA* e *FBXW7* correspondem às principais alterações encontradas na população nacional. Esses resultados são similares ao perfil molecular de outras populações, o que sugere potencial uso de biomarcadores. Entretanto, há uma escassez de dados de perfil molecular no Brasil (34,35).

Nesse contexto, adotamos uma estratégia de investigação dos principais genes e oncogenes já mapeados para analisar amostras regionais de pacientes do SUS (HUB), utilizando o painel compreensivo Oncomine Comprehensive Assay Plus (OCA Plus), contendo mais de 500 genes principais e mutações patogênicas sabidamente envolvidas na carcinogênese humana.

Este painel proporciona uma variedade de dados que desvendam padrões consistentes de alterações moleculares, permitindo associações entre diferentes tipos de cânceres. Este estudo busca criar um perfil das principais alterações moleculares presentes em tecidos tumorais de pacientes diagnosticados e operados no Hospital Universitário de Brasília, residentes no Distrito Federal. Para isso, utilizamos um painel inovador, capaz de identificar, com alta sensibilidade e especificidade, mutações policlonais de baixa frequência.

## **2.0 OBJETIVOS**

### **2.1.1 - OBJETIVOS GERAIS**

Investigar de forma abrangente e individualizada, as principais alterações moleculares encontradas em tecidos tumorais de pacientes com câncer colorretal operados no Hospital Universitário de Brasília.

### **2.1.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Análise bioinformática em bancos de dados públicos (nCBIO, COSMIC)
- Coleta de fragmento tumoral cirúrgico e extração de DNA e RNA das células tumorais
- Identificar o perfil de mutações no tumor de cada paciente (SNV, INDELS, TMB, número de mutações)
- Identificar e associar os genes e suas mutações mais frequentes na coorte analisada
- Correlacionar os principais genes com dados clínicos
- Descrever os principais genes e mutações analisadas
- Mapeamento compreensivo do perfil genômico do CCR para utilização como biomarcadores para detecção por biópsia líquida.

### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1- Fluxograma**

Os pacientes incluídos no estudo apresentavam diagnóstico patológico confirmado de adenocarcinoma. Foram adotados como critérios de exclusão indivíduos com histórico prévio de neoplasia ou que já haviam sido submetidos a intervenções terapêuticas. Após o estadiamento, os pacientes foram encaminhados para tratamento neoadjuvante ou cirurgia com intenção curativa.

#### **3.2- Coleta e Identificação dos Tecidos Tumorais**

A coleta de 24 amostras de tecido tumoral foi realizada durante o procedimento cirúrgico de cada paciente. Além disso, foram obtidas amostras sanguíneas em três momentos distintos da operação: antes do início da cirurgia (pré-operatório), durante a ressecção da peça tumoral (intra-operatório) e após o término da cirurgia (pós-operatório), para posterior análise de cfDNA.

Para cada coleta, 20 mL de sangue arterial foram extraídos em tubos EDTA K3. As amostras foram processadas em até duas horas e o plasma armazenado a -80°C para preservação da integridade molecular.

O protocolo de coleta foi padronizado com o objetivo principal de minimizar a degradação das amostras e manter a qualidade das amostras para processamento (Figura 4). A coleta foi realizada em tecido fresco, seguido de congelamento imediato (fresh-frozen), garantindo melhor qualidade na obtenção de material genético. [\(Figura 4\).](#)

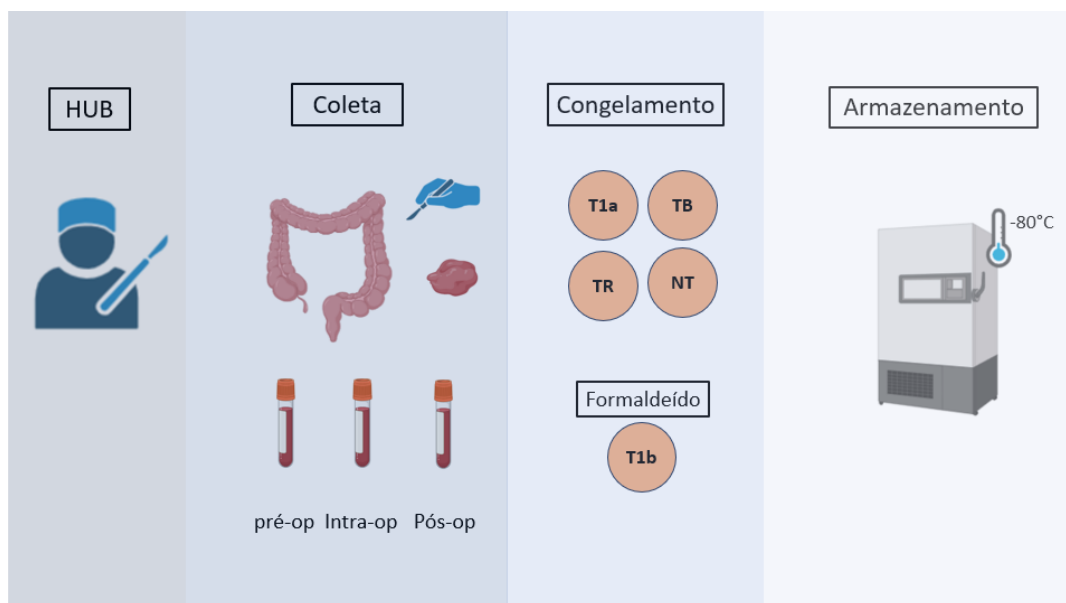


Figura 4: Fluxograma de coleta das amostras no Hospital Universitário (HUB), metodologia de coleta das amostras (n=5) intra cirúrgicas e coleta de sangue intra operatório, e devido armazenamento das amostras em freezer -80°C.

A coleta de tecido tumoral foi realizada após a abertura da peça cirúrgica, expondo a lesão tumoral por meio da dissecção da musculatura lisa da camada longitudinal do cólon (Figura 5A). Foram coletados cinco fragmentos de tecido, e armazenados em tubos criogênicos:

- **T1a/T1b** → Dois fragmentos espelho do centro da lesão tumoral.
- **TB** → Fragmento da borda da lesão tumoral.
- **TR** → Fragmento randômico da peça cirúrgica.
- **NT** → Fragmento de tecido normal.

Os fragmentos **TB** e **TR** são coletados de lados opostos para aumentar a capacidade analítica da heterogeneidade do tumor.

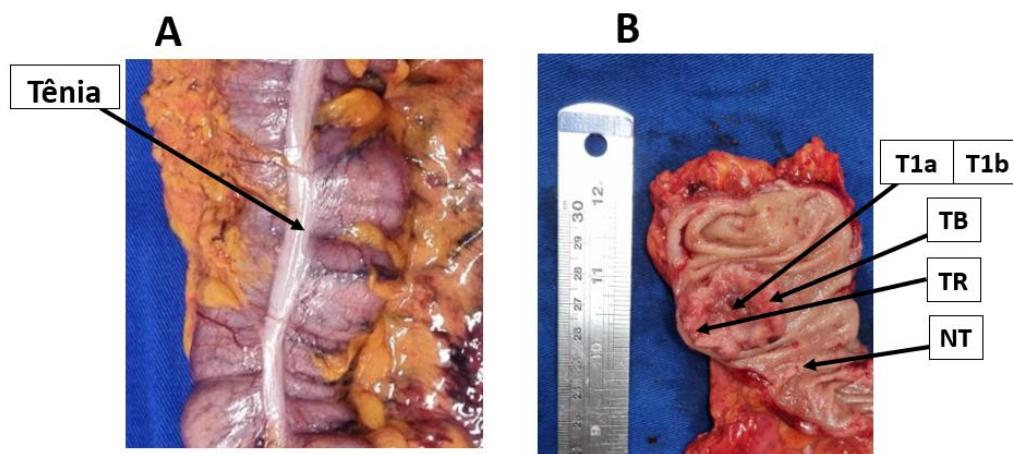


Figura 5: (A) Cólon com evidência na musculatura lisa longitudinal, tência. (B) Pontos de coleta de fragmentos tumorais. Os fragmentos TB e TR são coletados de lados opostos para aumentar a capacidade analítica da heterogeneidade do tumor.

Os fragmentos foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$ , com exceção do **T1b**, que foi fixado em formol a 10% para posterior confirmação histopatológica de adenocarcinoma. O fragmento **T1a** foi destinado ao isolamento de DNA e RNA para sequenciamento de nova geração, enquanto os demais foram preservados para análises futuras da heterogeneidade tumoral (Figura 5 B).

### 3.3- EXTRAÇÃO DE DNA/RNA TUMORAL

A extração e processamento do material genético tumoral foram feitos através do kit comercial AllPrep DNA/RNA Ultra Kit (Agilent), que proporcionou resultados satisfatórios em termos de pureza e concentração do DNA e RNA extraídos.

A quantificação dos materiais genéticos foi realizada por espectrofotometria (NanoDrop One, ThermoFisher), ensaio fluorométrico (Qubit 4, ThermoFisher) e eletroforese automatizada (TapeStation 4200, Agilent), garantindo a qualidade necessária para aplicações posteriores.

### 3.4- CHAMADA DE VARIANTES

A amostragem inicial do estudo conta com 22 pacientes com adenocarcinoma de cólon e/ou reto. Com isso, foram sequenciados 24 fragmentos tumorais utilizando o painel específico para mais de 500 oncogenes. Dois pacientes eram portadores de tumores sincrônicos, e nesses, foram analisados dois fragmentos tumorais distintos. Para a construção das bibliotecas, foram utilizados 20 ng de DNA e RNA por amostra. Com quantificação realizada via Ion Library TaqMan™ Quantitation Kit, as bibliotecas foram normalizadas a uma concentração de 50 pM, conforme recomendado, e carregadas no Ion 550 Chip, sendo posteriormente sequenciadas na plataforma Ion S5 Plus.

Durante o sequenciamento, a incorporação de nucleotídeos gera dados brutos que são processados localmente e transferidos para o servidor interno. O primeiro passo da análise consiste no base calling, processo que identifica as bases incorporadas com base nos sinais detectados. Ele analisa se o sequenciamento teve a cobertura mínima acima de 800x para ser sequenciada com precisão. Para isso, o carregamento do chip precisa ser acima de 80% de carregamento das esferas ISP e com baixa taxa de análise policlonal (<30%)

O controle de qualidade do sequenciamento inclui os seguintes parâmetros:

- Porcentagem de alinhamento: mínima recomendada de 97% de bases alinhadas ao genoma de referência (hg19);
- Tamanho médio das leituras: superior a 85 pares de base (bp) para DNA e 50 bp para RNA;
- Parâmetros AQ17 e AQ20: utilizados para verificar a qualidade do alinhamento dos amplicons e detectar erros de sequenciamento;
- Uniformidade da cobertura: recomendada acima de 90%;
- Leituras mapeadas por corrida (mapped reads): 100-120 milhões;
- Precisão média (Mean Raw Accuracy): idealmente acima de 99%.

Após o controle inicial, os dados são enviados para a plataforma Ion Reporter, onde ocorre a chamada de variantes (variant calling). Essa etapa utiliza o Torrent Variant Caller (TVC), que aplica algoritmos estatísticos para identificar e

classificar variantes com base na cobertura, frequência alélica e distribuição de leituras. As variantes são categorizadas em três classes:

- Positivas: quando há ao menos duas detecções válidas da mesma alteração;
- Negativas: na ausência de detecção;
- No Call: quando os critérios de qualidade não são atendidos.

As variantes identificadas incluem Single Nucleotide Variants (SNVs), inserções e deleções (INDELs), variantes multinucleotídicas (MNVs), bem como eventos mais complexos, como frameshifts e nonframeshifts.

Entre os principais parâmetros utilizados pelo TVC para controle de qualidade destacam-se:

- Cobertura mínima por variante: geralmente >250x (ajustável por tipo de variante);
- Frequência alélica mínima (Variant Allele Frequency - VAF): usualmente >0,05 (5%);
- Strand Bias: distribuição balanceada entre leituras forward e reverse, com tolerância de até 0,9 para regiões hotspots;
- Minimum Variant Score: limiar mínimo para validação estatística da variante;
- Classificações funcionais: como frameshift, truncating, gain-of-function e loss-of-function;
- Formato de saída: os resultados são gerados em Variant Call Format (VCF), contendo a posição genômica e tipo de alteração.

Com base nesse pipeline, foi possível detectar e classificar variantes somáticas, avaliar o Tumor Mutational Burden (TMB), investigar a alteração do aminoácido da proteína mutada e estimar a frequência alélica das alterações, garantindo robustez e reprodutibilidade na interpretação dos dados genômicos tumorais.

### 3.5- BANCO DE DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados encontrados sobre mutações e genes patogênicos foram comparados com de bancos de dados genômicos de referência como Cbio, NCBI, COSMIC. As alterações foram analisadas de acordo com o ClinVar e GeneCards. As mutações encontradas foram correlacionadas com os níveis de aprovação de terapias alvo pelo FDA, através do OncoKB, Além disso, dados divulgados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e INCA, foram utilizados para determinar a epidemiologia do câncer colorretal no Brasil e no mundo.

Foi realizado uma análise de banco de dados das principais alterações genéticas encontradas no CCR. No cBio, foram analisados 1089 genes que possuem até 5% de frequência dentro das coortes analisadas. Mutações raras foram encontradas e comparadas através do portal GeneCards.

Os dados obtidos através do sequenciamento de nova geração foram filtrados pelo próprio *Ion reporter* e analisados através do software GraphPad Prims 9. Foram realizados teste de correlação de Pearson e Wilconx. Os valores de p inferiores a 0,05 foram considerados estatisticamente significativos e representados por um asterisco.

### 3.6- APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

A pesquisa foi realizada com pacientes diagnosticados e tratados pelo Hospital Universitário de Brasília. O processamento das amostras (extração, quantificação e sequenciamento) foi realizado no Laboratório de Patologia Molecular da Faculdade de Ciências da Saúde na UnB. A utilização das amostras dos pacientes, no presente estudo, foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa sob parecer de número 65822222.4.0000.0030.

## 4. RESULTADOS

### 4.1- PERFIL CLÍNICO

Neste estudo, foram incorporados 22 pacientes com adenocarcinoma colorretal que realizaram cirurgia no Hospital Universitário de Brasília entre os anos de 2023 e 2025. Entre os 22 pacientes no estudo, foram coletados 24 tecidos tumorais, uma vez que os pacientes CBL87 e CBL102 possuem tumores sincrônicos ao qual foram determinados como dois tumores diferentes e analisados individualmente como CBL87a e CBL87b, CBL102a e CBL102b.

A coorte analisada, é composta por 14 pacientes com câncer de cólon e 8 de câncer de reto. Entre os de cólon, 9 possuem tumor do lado esquerdo (cólon descendente, sigmóide e retosigmóide) e 5 do lado direito (Figura 6). A média de idade dentre os 22 pacientes com CCR analisados, foi de 60 anos, com predomínio de pacientes acima dessa faixa etária (59%). Esses achados são similares à um estudo feito pelo UK 100.000 Genome Project, que identificou uma mediana de idade de 69 anos (23-94) entre 2.023 pacientes analisados (9). De forma notável, observa-se uma proporção relevante de pacientes com idade  $\leq 59$  anos (40,9%), ressaltando que 13,6% dos pacientes estudados possuem menos de 50 anos.

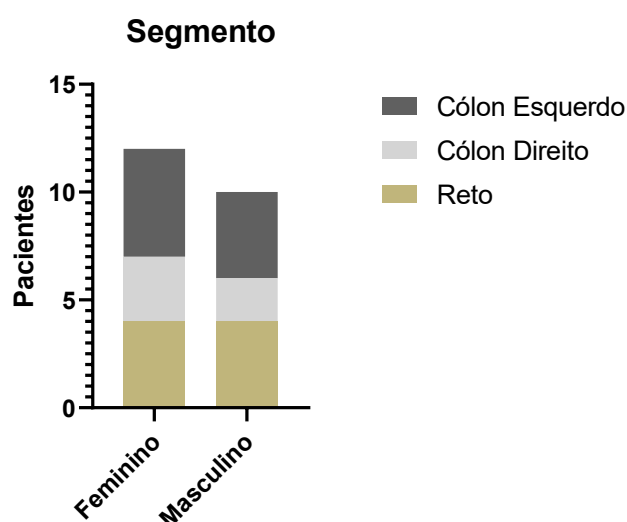


Figura 6 :Distribuição de localização tumoral (segmento) entre os pacientes do sexo feminino e masculino.

Entre os dados clínicos dos pacientes (Tabela 1), as mulheres compõem 54% dos casos enquanto que a média de idade dos pacientes homens, no momento do início do estudo, foi de 64,9 anos, em comparação ao sexo feminino com média de 57,25 anos. De acordo com o estadiamento TNM, 10 pacientes são TIII, 5 são TIV e apenas dois pacientes TI. Enquanto isso, 11 são estágio N1 e 1 paciente N2. Em 5 pacientes não foi possível determinar o estadiamento até o momento. Além disso, nenhum paciente apresentou metástase (M0). Portanto, de acordo com a AJJC (American Joint Committee on Cancer), 17 pacientes são classificados como estadiamento clínico 3, em comparação com os estágios 2 (n=3) e 1 (n=2) (Figura 7A). Além, disso, a tomografia computadorizada demonstrou volume tumoral médio de 61,96 cm<sup>3</sup> ( $\pm 80,62$ ) e moda de 45,50cm<sup>3</sup> entre os pacientes (figura 7B), com destaque para o CBL18 com volume tumoral de 389,1 cm<sup>3</sup>.

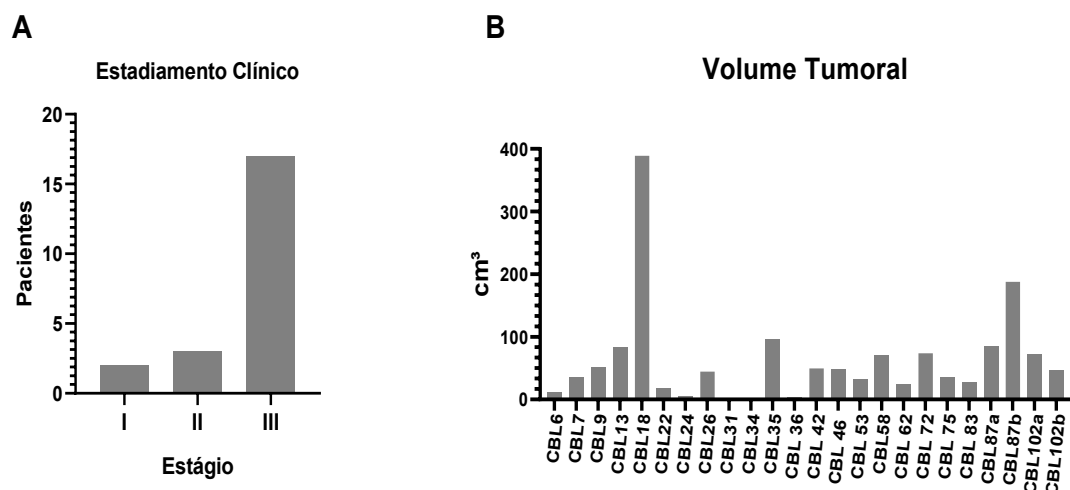


Figura 7: Caracterização tumoral por estadiamento clínico (A). Distribuição dos volumes tumorais (em cm<sup>3</sup>). Outliers evidenciam casos com volumes significativamente maiores (B).

Outros dados clínicos mostraram que 13 pacientes possuem algum tipo de comorbidade como hipertensão arterial sistêmica (HAS) ou diabetes mellitus (DM). Seis pacientes fazem uso de tabaco e bebida alcoólica, porém apenas 2 pacientes fazem uso dessas substâncias em conjunto. Em geral, os pacientes apresentaram um IMC médio de 25,35kg/m<sup>3</sup>. O estadiamento clínico dos pacientes, com base no TNM e classificação AJJC, demonstrou que 58% dos

pacientes são estadiamento 3, ou seja, estes pacientes possuem maior comprometimento linfonodal e invasão local mais agressiva.

Entre os pacientes, 8 tiveram invasão angiolinfática, enquanto 10 não apresentaram. Não foi possível constatar esse dado em 6 pacientes. Além disso, 3 pacientes realizaram terapia neoadjuvante com FOLFOX, Capecitabina e radioterapia.

Tabela 1: Análise descritiva de caracterização clínica das variáveis dos pacientes

| Variáveis Clínicas          |                | n  | %     |
|-----------------------------|----------------|----|-------|
| Idade                       | <60            | 10 | 45,45 |
|                             | >60            | 12 | 54,54 |
| Sexo                        | Feminino       | 12 | 54,54 |
|                             | Masculino      | 10 | 45,45 |
| Localização Tumoral         | Cólon Direito  | 3  | 12,15 |
|                             | Cólon Esquerdo | 13 | 54,16 |
|                             | Reto           | 8  | 33,33 |
| Estadiamento Clínico        | I              | 2  | 9,09  |
|                             | II             | 3  | 13,63 |
|                             | III            | 17 | 77,27 |
| Invasão Angiolinfática      | Sim            | 9  | 40,9  |
|                             | Não            | 10 | 45,45 |
| Invasão perineural          | Sim            | 6  | 27,27 |
|                             | Não            | 9  | 40,9  |
| Mucinoso                    | Sim            | 6  | 27,27 |
|                             | Não            | 12 | 54,54 |
| Comorbidades                | Sim            | 7  | 31,81 |
|                             | Não            | 8  | 36,36 |
| CEA                         | <5 ng/mL       | 11 | 50    |
|                             | >5 ng/mL       | 11 | 50    |
| Grau de diferenciação       | I              | 6  | 25    |
|                             | II             | 14 | 58,33 |
|                             | III            | 4  | 16,66 |
| Neoadjuvante                | Sim            | 3  | 18,18 |
|                             | Não            |    | 4,54  |
| Obstrução de Luz Intestinal | <80%           | 5  | 22,72 |
|                             | >80%           | 6  | 27,27 |

Entre os pacientes masculinos e femininos, não houve diferença de volume tumoral nem do marcador antígeno embrionário CEA ( $p>0,05$ ) (Figura 8 A e B). A quantidade e carga (TMB) de mutações encontradas entre os pacientes também não foi significativa. (Figura 8 C e D).

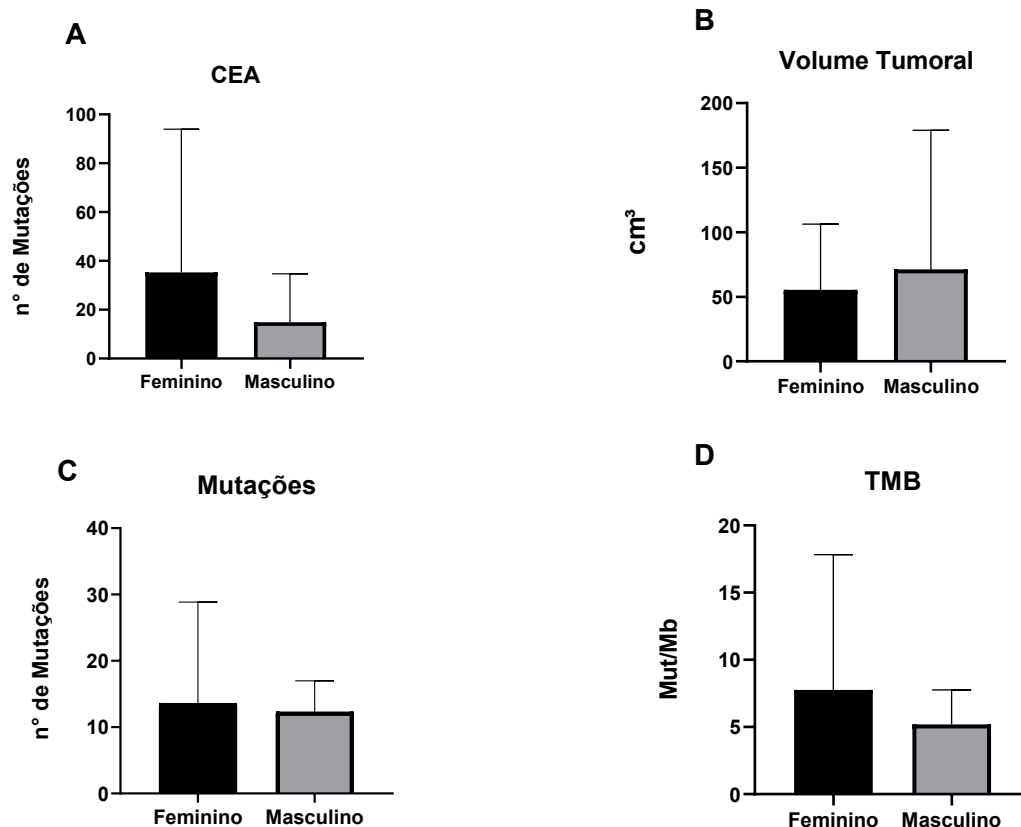


Figura 8: (A) Análise de distribuição do marcador antígeno embrionário (CEA) ( $p = 0,765$ ); (B) Volume tumoral em  $\text{cm}^3$  ( $p = 0,820$ ); (C) Número de mutações entre os pacientes do sexo feminino e masculino ( $p = 0,441$ ); (D) Quantidade de carga tumoral ( $p = 0,943$ ) entre os pacientes femininos e masculinos. Os resultados foram analisados por teste T de comparação, considerando  $p < 0,05$ .

Entre os pacientes, 8 foram acometidos por invasão angiolinfática, enquanto 12 não tiveram invasão. Entre estes grupos, não houve diferença em relação ao número de mutações ( $p = 0,296$ ). Os pacientes com  $\text{CEA} > 5$  e abaixo de 5 não apresentaram diferença em relação ao TMB. Também não houve diferença entre os grupos em relação ao volume tumoral.

## 4.2- QUALIDADE DO DNA / RNA

Entre os 22 pacientes no estudo, foram coletados 24 tecidos tumorais, uma vez que os pacientes CBL87 e CBL102 possuem tumores sincrônicos ao qual foram determinados como dois tumores diferentes e analisados individualmente como CBL87a e CBL87b, CBL 102a e CBL 102b. Os fragmentos foram processados e o DNA e RNA isolados com kit All Prep DNA/RNA Ultra Kit, e quantificados através de espectrofotometria, fluorometria e eletroforese. Em média, foram obtidos 492,7 ng/uL de DNA e 591,9 ng/uL de RNA para cada amostra, quantidade suficiente para o input necessário para as bibliotecas. Com isso, foram feitas diluições para 20ng/uL em 100uL de água *nuclease-free*, com base na quantificação do Qubit. Foi utilizado então 1uL da diluição para a construção das bibliotecas genômicas. A integridade do material genético obtido foi analisada por eletroforese automatizada, demonstrando a integridade do DNA e RNA genômico.

Em geral, as amostras de DNA estavam acima de 10 mil pares de base, como esperado para DNA genômico, apresentando alta intensidade de fragmentos de DNA com mínima degradação (Figura 9 A). O RNA apresentou degradação parcial, porém sem comprometer sua integridade total, uma vez que a maioria dos fragmentos de RNA estavam acima de 200 nucleotídeos, o suficiente para realizar as leituras dos amplicons durante o sequenciamento (50pb). Essa quantificação foi feita através da ferramenta DV200 no software TapeStation Analysis Software 5.1 onde demonstrou que todas as amostras tiveram  $\geq 60\%$  de RNA acima de 200pb (Figura 9 B).

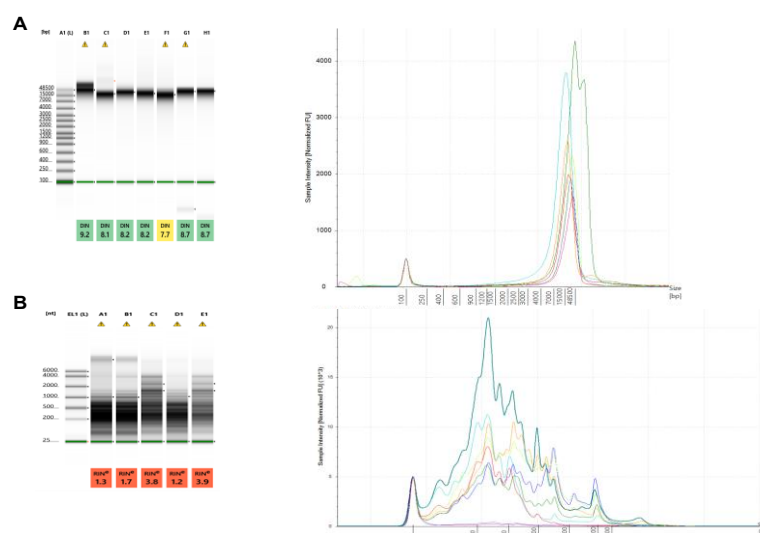


Figura 9: Eletrofenograma das amostras de DNA. O primeiro pico representa o lower marker, com 400 pb, representando o controle de referência para as amostras. Os demais picos alongados representam a alta intensidade de gDNA, enquanto seu formato afiado “sharp” demonstra a integridade do material.

### 4.3 GENES MUTADOS

No total, foram encontrados 194 genes com pelo menos uma mutação. Em média, os pacientes apresentaram  $12,96 \pm 11,07$  genes mutados por tumor, como representado na figura 10. Entre estes, o CBL 72 destaca-se com maior número de genes alterados encontrados pelo painel, com total de 60 genes alterados, seguido do CBL 31 com 31 genes mutados. Portanto, a frequência de mutações por paciente varia entre 1 e 24 mutações por amostra.

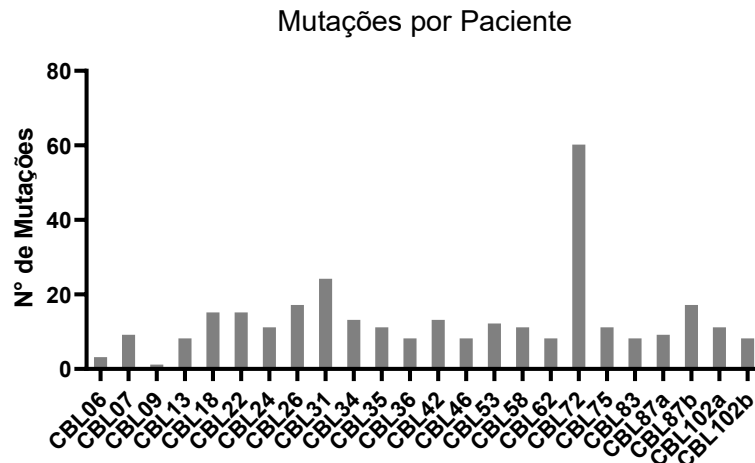


Figura 10: Distribuição dos pacientes do estudo com a quantidade de mutações presentes entre eles.

Para eliminar genes raros que tiveram apenas 1 ocorrência na coorte, e permitir assim uma amostragem mínima para análises estatísticas, foram selecionados genes que tiveram 2 ou mais ocorrências entre a coorte, compondo assim 35,56% dos genes encontrados (n=70).

Com um total de 346 mutações encontradas entre os 194 genes (Figura 11) alguns pacientes se destacam com maior carga mutacional. Além disso, também foi possível determinar a frequência de mutações entre os genes chamados. Com isso, a taxa de detecção foi de 100% dentro da coorte analisada, ou seja, foi detectado pelo menos uma mutação em cada paciente.

Assim, foi possível estabelecer um perfil com os 69 principais genes encontrados, além de identificar os pacientes que tiveram maior frequência de alterações entre estes genes principais (Figura 12 A). Assim, pode-se estabelecer um perfil de candidatos a análises mais aprofundadas e frequência de genes mutados (Figura 12 B).

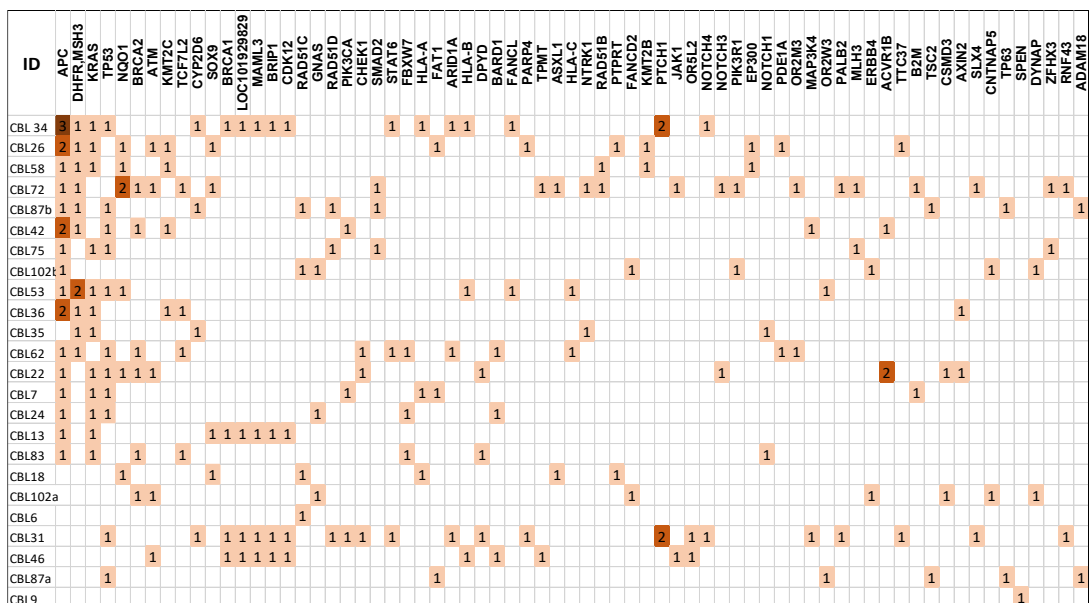


Figura 11: Heatmap da análise de genes e mutações por paciente, evidenciando os principais genes e os respectivos pacientes com suas mutações.

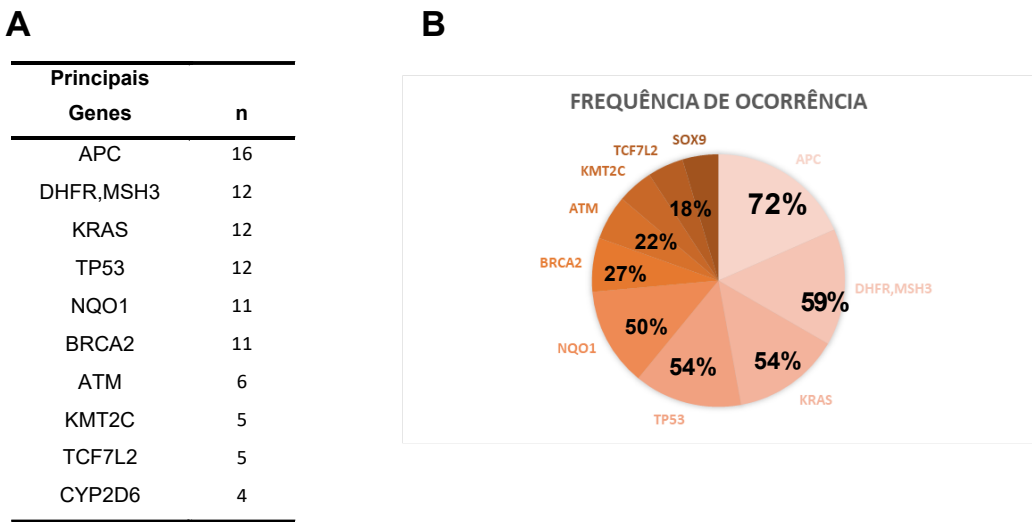


Figura 12: Os 10 principais genes presentes e a quantidade de pacientes com pelo menos 2 mutações por gene (A). Ocorrência de mutação nos 10 genes mais frequentes na coorte (B).

É possível identificar um padrão de genes relacionados à supressão tumoral como *APC*, *TP53*, além de genes que atuam no crescimento celular como o *KRAS*, e vias de reparo de incompatibilidade de erros durante a replicação celular. Além de uma variante rara (*NQO1*) encontrada em menos de

1% dos pacientes com CCR (36). Mutações nestes genes podem gerar diferentes efeitos na transcrição, podendo interromper a síntese da proteína, danificando sua estrutura e funcionalidade dentro das vias de reparo. Sendo assim, dentro da nossa coorte, algumas mutações foram classificadas como *unknown*, portanto não foi possível determinar o tipo de alteração do aminoácido (p.?), e estes foram excluídos das análises de classificação. Com isso, foi possível determinar 311 mutações distribuídas entre os 194 genes nos fragmentos tumorais. As mutações encontradas foram classificadas de acordo com seu tipo de alteração.

No total, 214 mutações foram do tipo de troca de nucleotídeo única (SNV) quando há substituição de um aminoácido na proteína, afetando sua função tornando-a menos funcional ou inativada. 88,31% dessas alterações são do tipo missense, causando perda de sentido na transcrição (Figura 13 A). Entre estes, 30 tiveram efeitos de ganho de função, enquanto 21 tiveram perda de função. Em seguida, as 35 alterações do tipo LOH tiveram 100% de efeito perda de função, isso porque a perda de um alelo funcional, reduz sua expressão gênica e contribui para a inativação de genes de supressão e progressão tumoral (37). Com isso foi observada associação altamente significativa entre o tipo de mutação missense e nonsense, e sua classificação funcional de ganho ou perda de função, com destaque para o fato de que todas as mutações nonsense foram classificadas como perda de função, enquanto mutações de ganho de função ocorreram exclusivamente em alterações SNV com substituições do tipo missense ( $p < 0,0001$ ). Dentre esses, apenas um caso de mutação ganho de função no tipo MNV (Figura 13 B).

Os diferentes tipos de alterações causadas por mutações nestes genes, contribuem diretamente para a carcinogênese do CCR. Por isso, selecionamos os genes com maior frequência de ocorrência dentro dos 24 fragmentos tumorais.

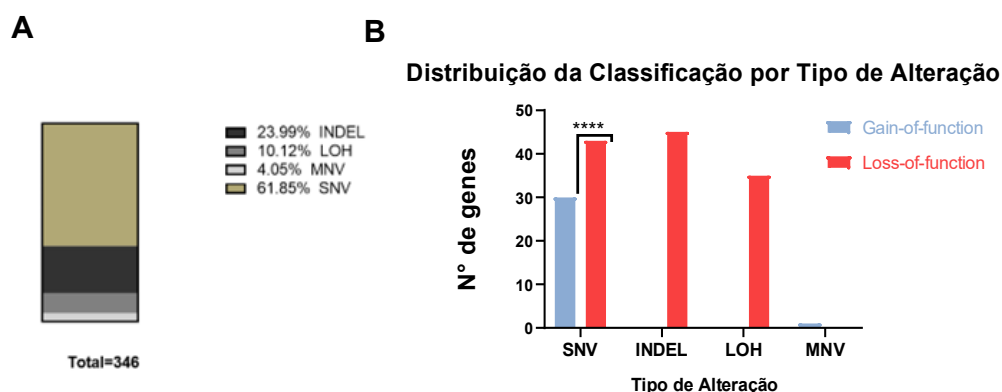


Figura 13: (A) Tipos de mutações encontradas entre os 194 genes mutados nos 24 pacientes. SNV possui representatividade maior que INDEL, LOH e MNV  $p < 0,05$  (spearman  $r$  test). (B) Comparação de Variantes de Ganho e Perda de Função dos genes encontrados. As barras azuis representam variantes de ganho de função, enquanto as vermelhas indicam variantes de perda de função, evidenciando leve predominância de variantes deletérias. Evidenciando a associação entre alterações SNV com tipo ganho de função (Teste Fisher,  $p < 0,0001$ ).

#### 4.4 PRINCIPAIS GENES

Entre os 69 genes selecionados, foram escolhidos os 20 genes principais genes com maior frequência entre os pacientes, assim como a quantidade de mutações em cada um (Figura 14). Assim, o gene *APC* aparece como primeiro gene mais frequente na coorte, com 16 pacientes afetados com 20 mutações no *APC* distribuídas entre eles. O paciente CBL34, por exemplo, possui 3 mutações exclusivas no mesmo gene *APC* A1670P, G471\* e D1498Vfs5\*, sendo esta última uma mutação frameshift que gera um códon de parada prematuro, causando perda de função devido a proteína truncante gerada. Essas mutações afetam principalmente a via Wnt/ $\beta$ -catenina, responsável pela manutenção da via de ativação de oncogenes e supressão tumoral. As mutações truncadas no gene *APC* representam eventos iniciais cruciais na tumorigênese do câncer colorretal. Essas alterações genéticas, que podem ser de origem germinativa ou somática, resultam na produção de uma proteína *APC* incompleta, comprometendo significativamente sua função como reguladora negativa da via

Wnt/ $\beta$ -catenina. A perda funcional do *APC* ocorre geralmente acompanhada de um segundo evento mutacional, como deleção, inserção ou silenciamento epigenético, ao atingir o alelo remanescente levando a inativação completa do gene. Além disso, a expressão de mutações truncadas induz a instabilidade cromossômica (CIN). Essa instabilidade favorece a progressão tumoral e heterogeneidade intratumoral. Portanto, o comprometimento precoce do *APC* pode exercer um papel central na iniciação e evolução do adenoma para carcinoma invasivo. (38)

Em seguida, o *KRAS* aparece em segundo lugar (n=12/24) (Figura 14), sendo o tipo G12D mais frequente (5/12) seguido do G12V (3/12). O *KRAS* G12V é normalmente encontrado em câncer de pulmão, pâncreas e colorretal. Logo, a mutação em conjunto *DHFR,MSH3*, que pode estar relacionada a sua proximidade genômica. Seguido do *TP53* e *NQO1*, sendo este último, um gene responsável por vias de metabolismo de estrogênio e aminoácidos, e fator de síntese de fator de transcrição NRF2 responsável por regulação de vias de defesa antioxidante e desintoxicação, podendo ser ativado facilmente por enzimas quinase (PI3K, ERK) o que facilita a translocação para o núcleo da célula e ativando resposta antioxidante. O *NQO1* está envolvido diretamente na defesa contra o estresse oxidativo e detoxificação de medicamentos quimioterápicos.(39)

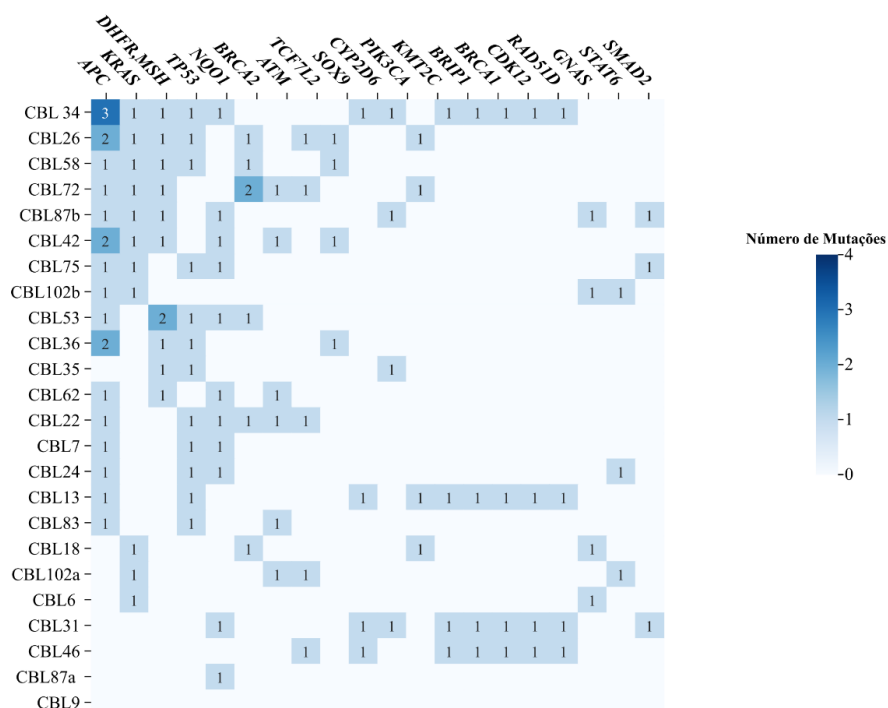


Figura 14: Heatmap com os 20 principais genes mutados encontrados entre as 24 amostras de tecido tumoral colorretal. Demonstrando genes apresentam maior carga mutacional e quais têm menor frequência de mutações entre eles. Destaque para os genes APC, DHFR,MSH3 e BRCA2 que apresentaram mais de uma mutação em um mesmo paciente.

A regulação da via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina pelo *APC*, através de degradação por ubiquitinação (40), é responsável pela diminuição da atividade da via e impedir a ativação descontrolada de genes oncogênicos. Além disso, quando a atividade do *APC* está diminuída, ocorre um aumento na ativação da via Wnt, resultando em hiperplasia e progressão tumoral (41). Mutações germinativas do *APC* causam a Polipose Adenomatosa Familiar (PAF) e pode ser responsável pelo desenvolvimento do CCR e adenocarcinoma gástrico (42,43). Em uma estudo em 15 bancos de dados, foram encontradas mutações neste gene em 66% das 4.477 amostras tumorais de CCR analisadas (44), em comparação com os 62,5% encontrados na nossa coorte. O que revela que este gene pode estar alterado em mais da metade da população com CCR.

#### 4.4.1 APC

Mutações somáticas no gene *APC* são consideradas eventos iniciais na carcinogênese do CCR. *APC* codifica uma proteína multifuncional com interações celulares através de transdução de sinal via sinalização Wnt, mediada por adesão intercelular, estabilização do citoesqueleto e regulação do ciclo celular. O *APC* faz parte de um dos diferentes caminhos de sinalização para a progressão tumoral sendo um marcador ideal para mutações associadas ao CCR (45). As mutações no *APC* foram associadas à via canônica através da associação com a via Wnt/  $\beta$ -catenina, correspondente a instabilidade genômica por mutações truncadas no gene, causando a perda de função dessa proteína. Por isso são classificadas como provavelmente oncogênica (46).

Algumas alterações são relacionadas a maior agressividade tumoral e menor resposta a terapias, além de atuar na regulação e crescimento celular, e são frequentemente encontradas em CCR metastático (*APC* C520\*, *APC* G471\*) (47). Além disso, essas duas mutações são classificadas como oncogênicas com provável perda de função (48), o que condiz com nossos achados, classificadas como sem sentido e com perda função. O truncamento precoce da proteína *APC*, afeta sua função supressora tumoral, associada a resistência à imunoterapia e menor infiltração de células imunes (*APC* E268\*) (49). Por fim, a mutação *APC* R213 é classificada como patogênica e com predisposição hereditária ao câncer de acordo com o OncoKB (50), e essas mutações formam uma rede de interação entre os pacientes que compartilham mutações no *APC*, evidenciando que alguns pacientes apresentaram mais de um tipo de mutação neste gene (Figura 15). (51)

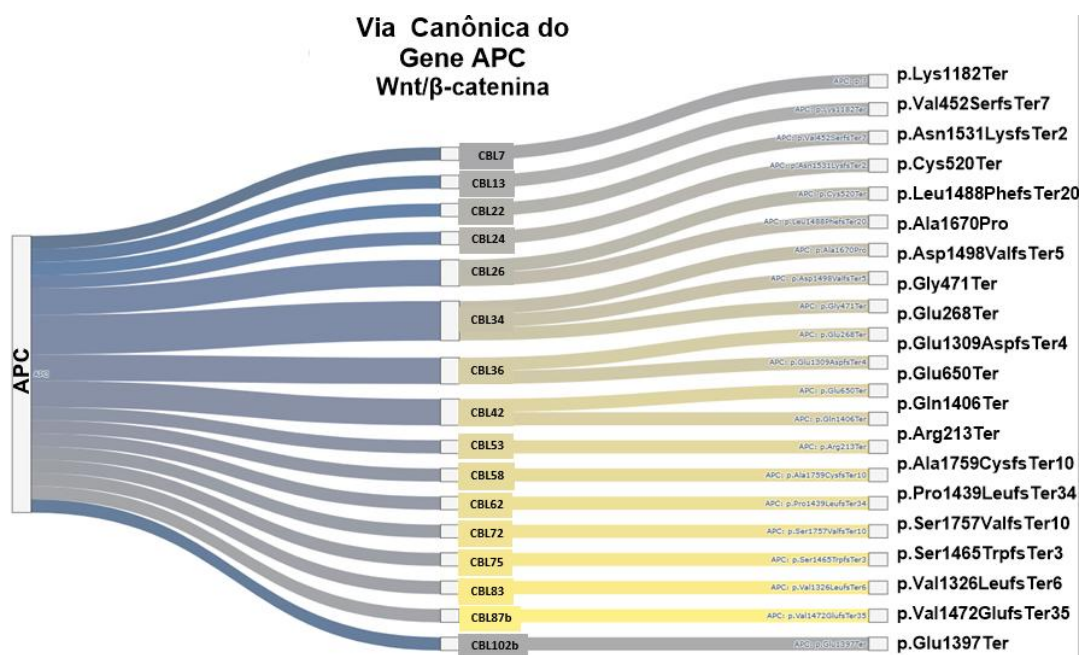


Figura 15: Sankeyplot das alterações de APC. No centro, os pacientes e suas respectivas mutações à direita (CBL13, CBL22, CBL24, CBL26, CBL26, CBL34, CBL36, CBL42, CBL53, CBL58, CBL62, CBL72, CBL75, CBL83, CBL87b, CBL102b).

#### 4.4.2 KRAS

O *KRAS* aparece em segundo lugar como gene patogênico mais presente na coorte analisada (n=6), responsável por regular a via de sinalização MAPK e é frequentemente encontrada em pacientes com câncer de pulmão, colorretal e pâncreas.(53) Foram encontradas 3 mutações *KRAS* p.Gly12Asp, duas *KRAS* p.Gly12Val e uma *KRAS* p.Gly12Arg compondo assim as mutações relacionadas a este gene, e são frequentemente encontradas no câncer colorretal.

O *KRAS* pertence à família de proto-oncogenes RAS, que sintetiza enzimas reguladoras através da ligação com guanosina trifosfato (GTP) envolvidas na transdução de sinal para crescimento e diferenciação celular. As proteínas RAS são ativadas quando trocam uma molécula de GDP (guanosina difosfato) por uma de GTP, isso ocorre logo após a ligação do complexo GRB2-SOS ao RTK (*RAS-MAPK pathway*). Esse complexo GRB2-SOS é fundamental no processo de regulação do crescimento celular e diferenciação através da via MAPK, facilitando a ativação das proteínas RAS e induzindo a cascata de sinalização. Um estudo de Seiler, C et al, revela um mecanismo de regulação negativa de

RAS, através da forma alternativa de GRB3-3, o que impede a sua translocação para a membrana plasmática e bloqueia a ativação de RAS. Dessa forma, GRB3-3 age como um supressor tumoral, reduzindo a sinalização MAPK em células normais e cancerígenas.

Ao ser ativada, a proteína RAS se liga ao GTP e inicia a cascata de ativação das vias MAP3K-MAP2K-MAPK (ERK) que fosforila as proteínas alvo e fatores de transcrição. Esse mecanismo pode levar a transcrição de genes específicos que regulam processos celulares, crescimento, proliferação e sobrevivência celular. MAP-K é essencial para comunicação de sinais extracelulares para o núcleo da célula, influenciando várias respostas celulares importantes. A ativação ou inativação anormal dessas vias de sinalização, como TGF- $\beta$  e MAP-Kinase podem contribuir para as características moleculares específicas do CCR, como proliferação celular, resistência a apoptose, invasão celular e metástase tumoral. Alterações diferentes nessas vias podem resultar em perfis moleculares distintos, influenciando a progressão do câncer e respostas a terapias direcionadas. (54)

*KRAS* p.Gly12Asp, ou *KRAS* G12D, possui papel oncogênico com ganho de função responsável por regulação da via MAPK (51). Essa mutação está relacionada a câncer de pulmão, colorretal, pâncreas e ovários (55), e é encontrada em aproximadamente 12% dos pacientes com CCR (56). A expressão dessa proteína em modelo animal demonstrou que sua ativação é proporcional ao aumento da ativação de vias de sinalização, induzindo a formação de colônias e desenvolvimento tumoral de múltiplas linhagens celulares em comparação à sua forma selvagem (WT) (57). Essa mutação foi encontrada em pacientes com leucemia de células cabeludas com resposta a tratamento com cobimetinib (58).

No CCR, essa mutação é classificada como nível R1 em relação a terapias aprovadas pelo FDA, e torna o paciente resistente a tratamentos com Cetuximab, Panitumumab e Tucatinib + Trastuzumab. *KRAS* G12V é classificada como oncogênica com ganho de função, e possui nível R1 de resistência às mesmas medicações que o *KRAS* G12D, porém para câncer de pâncreas, adenocarcinoma pulmonar de pequenas células, possui aprovação 3A com Daraxsonrasib, e nível 4 para terapia com essa medicação para tumores sólidos.

Em relação ao CCR, a mutação *KRAS* G12V possui nível 1 FDA de aprovação a terapia com Avutometinib + Defactinib em pacientes com câncer de ovário seroso de baixo grau, e nível 2 em terapias com Cobimetinib e Trametinib em pacientes com doença de Erdheim-Chester e histiocitose de células de Langerhans (51).

*KRAS* p.Gly12Arg (*KRAS* G12R) está relacionado aos cânceres de pulmão, colorretal, pâncreas e ovário. No CCR, a expressão dessa mutação diminui a ativação de caminhos de sinalização celular em comparação ao WT. Essa mutação, quando encontrada em pacientes com linfoma, causa resistência a medicações inibidores de *BRAF*, pois ela impede que o bloqueio de BRAF tenha efeito na via de sinalização MAPK, o que reduz a resposta ao tratamento. Entretanto, isso não afeta a sensibilidade aos inibidores de MEK, como Cotimetinib. Ou seja, quando encontradas em conjunto, mutações no *BRAF* e *KRAS* G12R, medicações que bloqueiam sinalizações da via MAPK podem ser ineficazes. (59)

#### 4.4.3 DHFR,MSH3

A fusão *DHFR/MSH3*, detectada em 50% das amostras da coorte estudada (n=24), pode indicar instabilidade genômica significativa, reforçando o papel crítico de *MSH3* na progressão tumoral e na resposta à terapia. Essa alteração afeta a expressão e função dos genes envolvidos, sendo *DHFR* essencial para a síntese de nucleotídeos e *MSH3* fundamental no reparo de incompatibilidades do DNA. Como consequência, a instabilidade genômica pode aumentar a vulnerabilidade tumoral e a sensibilização do tumor a quimioterápicos, mecanismo já observado em tumores deficientes em *MSH3* (60). Esses achados sugerem implicações relevantes na estratificação de pacientes para tratamentos personalizados, especialmente em tumores com deficiência no sistema MMR. Além disso, mutações germinativas de *MSH3* estão associadas à perda de função, instabilidade de microssatélites e maior risco de câncer colorretal, gástrico e adenomas duodenais.

A deficiência de *MSH3* compromete o reparo de quebras de fita dupla (DSB) do DNA, aumentando a sensibilidade celular à quimioterápicos como cisplatina e oxaliplatina. Células com baixa expressão de *MSH3* apresentam

níveis elevados de histonas associadas a danos persistentes e maior taxa de apoptose por essas medicações (60). Mutações germinativas de *MSH3* estão associadas à instabilidade de microssatélites e perda de função, além de serem implicadas na polipose adenomatosa e tumores gastrointestinais, como câncer colorretal e gástrico (61)

Os genes *MSH6* e *MSH2* são essenciais para o reconhecimento e correção de erros de replicação do DNA no sistema de reparo de incompatibilidades (MMR), sendo este último, encontrado em apenas um pacientes do nosso estudo. O gene *MSH3* atua como um parceiro alternativo de *MSH2*, formando o complexo responsável pelo reconhecimento de pequenas inserções e deleções. Mutações germinativas em *MSH3* podem agravar o fenótipo de mutações em *MSH6*, levando à degradação proteolítica de *MSH2*, frequentemente observada em tumores com alta instabilidade de microssatélites (MSI-H). Adicionalmente, mutações somáticas em *MSH3* podem comprometer a capacidade de ligação desse complexo, reduzindo a eficiência do reparo de DNA. Alterações simultâneas em *MSH3* e *MSH2* podem resultar na perda dos parceiros de ligação de *MSH6*, levando à degradação da proteína e consequente perda de função (62). Portanto, mutações em *MSH3* desempenham um papel indireto na progressão tumoral, contribuindo para a instabilidade genômica e influenciando a resposta à terapia ao comprometer a integridade do sistema de reparo do DNA.

De acordo com o OncoKB, alguns destes genes encontrados são consideradas oncogênicos principalmente em relação a outros tipos de cânceres, como por exemplo o gene *AKT1* e *AKT2*, responsáveis por produzir uma proteína *kinase* intracelular e, quando estes genes estão mutados, se associam principalmente ao câncer de mama e endométrio. Possui nível 2 de evidência terapêutica pelo FDA com terapia para câncer de mama com Capivasertib + Fulvestrant (OncoKB) e foram exclusivos no paciente CBL72. O gene supressor tumoral e co-ativador transcricional, *CREBBP*, também está alterado apenas no CBL 72 e é frequentemente inativado em alterações hematológicas. O gene *RAD51D* produz uma proteína de reparo de DNA frequentemente alterada em câncer de próstata e possui nível 3B de evidência pré-clínica com Olaparib (inibidor de PARP) em pacientes com mutação somática

de *RAD51D* e metastáticos com resistência à castração. Apesar disso, a utilização clínica deste medicamento ainda não é totalmente elucidada (63).

#### 4.4.4 TP53

O gene de supressão tumoral mais comum é o *TP53*, que codifica a proteína p53, responsável por supressão tumoral em eventos de dano ao DNA e ativação oncogênica através de indução de reparo do DNA, apoptose e outras respostas anti-tumorais. Conhecido como guardião do genoma, esse gene tem papel na resposta ao dano no DNA (DDR) e nas estratégias terapêuticas contra o câncer. O *TP53* é ativado por modificações pós-traducionais que estabilizam a proteína e a tornam funcional como fator de transcrição. Atuando na função central de checkpoints do ciclo celular, reparo de DNA, apoptose, senescência, metabolismo, autofagia e resposta imune. Mutações neste gene promovem instabilidade genômica por ganho de funções pró tumorais, promovendo evasão apoptótica e resistência terapêutica (64).

Em casos de dano no DNA, várias vias de sinalização são ativadas para detectar e reparar essas lesões celulares. O p53 é fosforilado por reguladores específicos que então se ligam a sequências específicas do DNA para direcionar a expressão de diversos genes envolvidos em ciclo celular e apoptose, reparo de DNA, metabolismo e diferenciação celular. Mutações neste gene geram uma proteína com perda de função, favorecendo a progressão tumoral, invasão celular, resistência a drogas e instabilidade genômica. Este gene é o mais frequentemente mutado em pacientes com câncer e pacientes com mutações neste gene possuem maior predisposição ao desenvolvimento da carcinogênese dos cânceres em geral. (65)

Diversos estudos destacam o papel funcional do p53 na manutenção da estabilidade genômica, atuando como regulador do ciclo celular, reparo de DNA e apoptose. Mutações em *TP53* não apenas comprometem essas funções, mas também conferem propriedades oncogênicas, sendo observadas em até 50% das neoplasias humanas (66), o que corrobora exatamente com nossa coorte, onde 50% dos pacientes (n=11) tiveram mutações neste gene.

Apenas a mutação *TP53* p.Arg249Ser foi considerada oncogênica pelo portal OncoKB com provável perfil *loss-of-function*. Essa mutação ocorre por uma troca do aminoácido arginina por uma serina na posição 249 da proteína p53. É uma mutação que compromete a capacidade de formar um complexo funcional com o DNA. Estudos *in vitro* demonstram que essa mutação pode causar uma distorção da superfície de ligação da proteína, causando uma agregação e disfunção dessa proteína defeituosa comparado às proteínas geradas pelo *TP53* WT (Wild Type) (67). Então, a superfície dessa proteína é essencial para a formação do complexo p53-DNA, e, em casos de proteína disfuncional, essa interação é distorcida e com perda de função, o que explica a classificação de *loss-of-function* como fator transcricional, permitindo assim a proliferação e, consequentemente, a oncogênese (68). Atualmente, estudos estão sendo realizados para validar o uso de inibidores de MDM2 com intuito de restaurar a função da proteína p53, porém o uso terapêutico aprovado pelo FDA ainda não é específico, sendo relatado uso de Rezatapopt para tratamento de tumores sólidos em geral (nível 3a-OncoKB).

#### 4.4.5 NQO1

Dentro do nosso painel, identificamos, com base no banco de dados ClinVar, 17 genes com mutações patogênicas ou provavelmente patogênicas, totalizando 44 variantes, com destaque no gene *NQO1* que teve mutação patogênica com maior ocorrência dentro da coorte estudada (Figura 16). Neste gene, foi encontrado apenas a mutação *NQO1* p.Pro187Ser, porém com maior frequência de acometimento entre as mutações patogênicas (n=11). Este gene é responsável pela produção da enzima quinone oxidoreductase, influenciando na resposta ao estresse oxidativo. Essa mutação está associada ao câncer colorretal, mas sua função exata ainda não foi elucidada. De acordo com GeneCards, mutações nesse gene são patogênicas no câncer de mama e correlacionada à menor sobrevida pós-quimioterapia, além de estar ligada à toxicidade ao benzeno e à suscetibilidade à leucemia secundária (69).

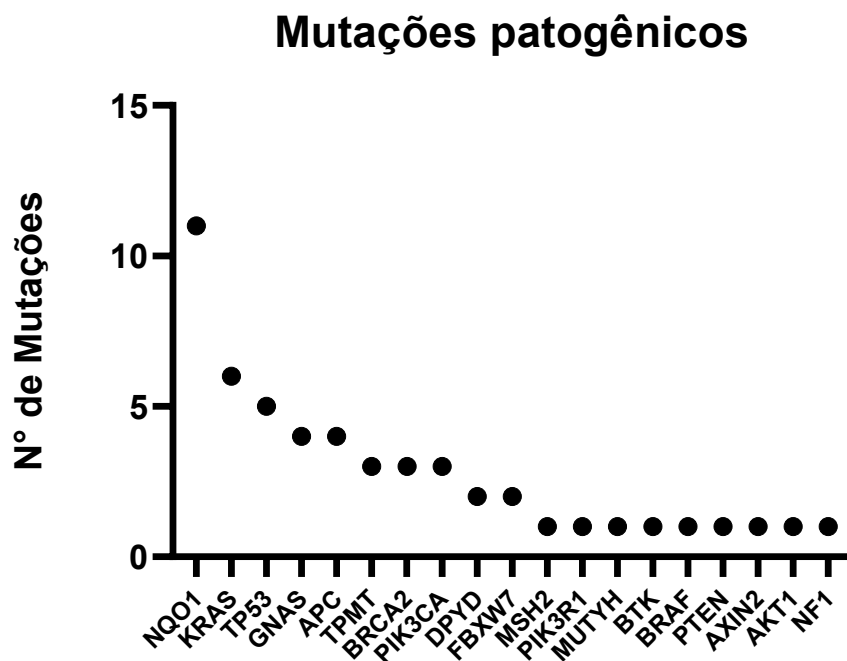


Figura 16: Genes classificados como patogênicos através banco de dados ClinVar inserido na plataforma OCA Plus.

O *NQO1* codifica uma enzima citosólica que catalisa a redução de quinonas (substâncias potencialmente tóxicas) em hidroquinonas menos reativas, utilizando o NAD(P)H como cofator. Esse processo evita a formação de radicais livres instáveis, como as semiquinonas, que podem gerar estresse oxidativo. Essa atividade faz do *NQO1* uma das principais enzimas que atuam na desintoxicação de fármacos e carcinógenos ambientais. Além disso, a expressão desse gene é regulada pela via NRF2-KEAP1, sendo induzida em resposta ao estresse oxidativo ou na presença de compostos fitoquímicos como cúrcuma e sulforafano, que possuem capacidade de interagir nessas vias de resposta a danos oxidativos e induzir morte celular seletiva em células tumorais.

De acordo com uma análise aprofundada no portal cBio com 4.233 pacientes com adenocarcinoma de colón e reto, a frequência dessa mutação ocorreu em menos de 1% da coorte analisada e relacionadas a alterações

missense. Em comparação com nossa coorte, que demonstrou 50% de ocorrência de mutação neste gene, sendo todas a mesma mutação p.Pro187Ser e do tipo missense. (36). Essa mutação corresponde a substituição de uma prolina por uma serina na posição 187 do códon. Essa mutação é classificada no COSMIC como COSV57731060 como substituição missense e confirmada como somática em diversos tumores como cólon, trato biliar, mama, próstata, estômago, e está associada a vias de metabolismo de aminoácidos, estresse oxidativo e metabolismo de estrogênio. Essa mutação é funcionalmente relevante porque reduz drasticamente a atividade da enzima *NQO1*, comprometendo a desintoxicação de quinonas, aumentando a suscetibilidade ao estresse oxidativo, favorecendo a carcinogênese. A substituição de prolina por serina nesta posição afeta um ponto crucial da estabilidade da proteína, prejudicando a conformação física deixando-a instável e mais suscetível à degradação. Isso compromete a capacidade da célula de controlar o estresse oxidativo através da degradação de quinonas. Essa variante também pode influenciar resposta a quimioterápicos, por isso é considerada em alguns protocolos de farmacogenética. Pacientes com genótipo homozigótico (Ser/Ser) possuem pior prognóstico devido a maior comprometimento de desintoxicação e favorecimento à progressão tumoral. Em câncer de pulmão não pequenas células, pacientes com este genótipo apresentaram menor sobrevida livre de progressão após radioterapia, em comparação com os genéticos Pro/Pro e Pro/Ser.

A mutação *NQO1* P187S é uma variante funcional comum associada à perda significativa da atividade enzimática da NA(P)H quinona oxiredutase. Essa substituição afeta a estabilidade estrutural da proteína, promovendo sua degradação e reduzindo sua capacidade de detoxicar quinonas e combater o estresse oxidativo. Como consequência, indivíduos homozogotos para essa mutação (Ser/Ser) apresentam menor proteção celular frente a agentes químicos e danos genômicos. Em câncer de pulmão e mama, o genótipo homozigoto foi associado a pior sobrevida livre de progressão e menor eficácia terapêutica, sugerindo que P187S pode servir como marcador prognóstico negativo e potencial modulador da resposta à fármacos.

Embora o impacto varie conforme o tipo de tumor e tratamento, a presença da mutação P187S em homozigose pode ser considerada um marcador de risco clínico e pode influenciar decisões terapêuticas especialmente em contextos onde a atividade da *NQO1* é reconhecidamente reduzida ou ausente, comprometendo a eficácia de fármacos que dependem da bioativação por esta enzima, como certas quinonas, e demandando estratégias terapêuticas alternativas mais eficazes e menos dependentes da função da *NQO1*.

Diante da análise mutacional da coorte, destacaram-se um subconjunto de genes com maior frequência de alterações, com ênfase em *APC*, *TP53*, *KRAS*, *DHFR*, *MSH3*, e *NQO1*. A recorrência dessas mutações reforça o envolvimento funcional dessas vias genéticas na fisiopatologia do câncer colorretal. No entanto, para além da frequência isolada, é fundamental investigar se essas alterações genômicas se correlacionam com características clínicas dos pacientes, como estadiamento, marcadores séricos (CEA), volume tumoral, entre outros. Assim, a próxima etapa do estudo busca explorar essas possíveis associações entre dados moleculares e variáveis clínicas, com o objetivo de identificar genes potencialmente associados a fenótipos clínicos mais agressivos ou marcadores prognósticos relevantes.

#### 4.5- ASSOCIAÇÕES GENÉTICAS E DADOS CLÍNICOS

Apenas um paciente teve mutações nos 5 principais genes (CBL34), tendo um perfil tumoral provavelmente mais agressivo, pois as alterações em conjunto nestes genes, tendem a potencializar os erros nas vias de sinalização, uma vez que mutações nestes genes atuam em vias em conjunto.

Os dados foram dicotomizados para associações entre os grupos. Os dados de CEA foram divididos entre acima de 5 ng/mL e abaixo desse valor. O TMB também foi dicotomizado em acima de 5 mutações por megabase e abaixo de 5 mut/Mb. Nas primeiras análises, foi possível verificar a correlação positiva moderada entre a carga tumoral (TMB) e a quantidade de mutações ( $p=0,0107$ ) encontradas nos pacientes (Figura 16 A). Em geral, os 22 pacientes, independente de terapia prévia, obtiveram resultados similares na correlação entre TMB e quantidade de mutações ( $p=0,0009$ ). A carga de CEA e TMB

também foi correlacionada entre os pacientes do sexo feminino e masculino, porém sem correlação significativa entre os grupos. Com isso, a correlação entre CEA >5ng/mL e <5ng/mL, e volume tumoral demonstrou uma correlação linear significativa (Figura 16 B).

Em geral, 54,55% dos pacientes homens tiveram um volume tumoral maior que as mulheres, e não houve associação significativa entre eles ( $p > 0,05$ ), nem do marcador antígeno embrionário CEA ( $p > 0,05$ ) (Figura 16 B). A quantidade de carga tumoral e mutações encontradas entre os pacientes também não foi significativa (Figura 16 C,D).

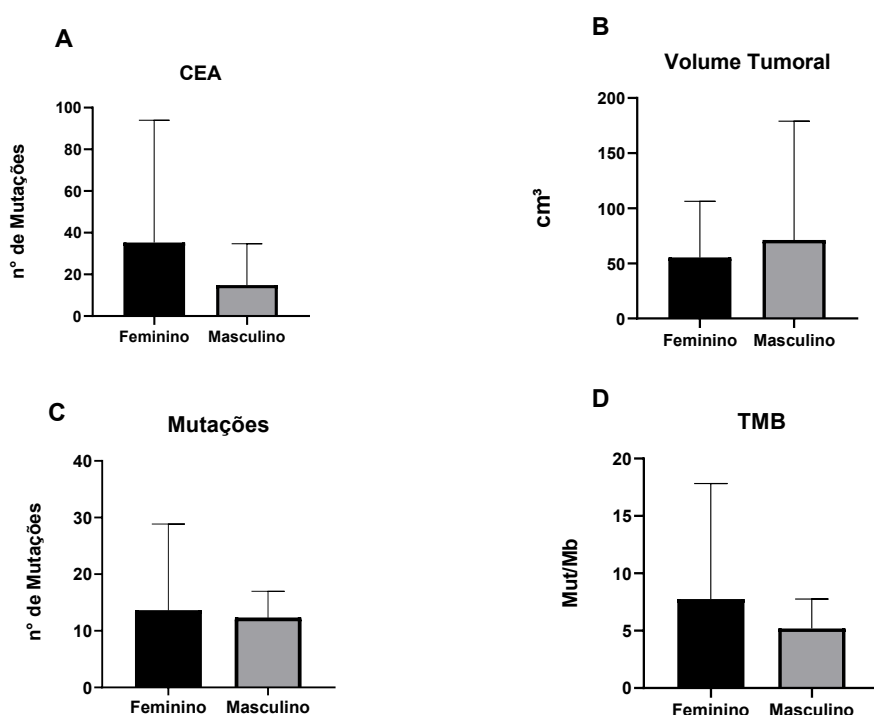


Figura 16: Análise de distribuição do marcador antígeno embrionário (CEA) ( $p=0,389$ ) (A); Volume tumoral em  $\text{cm}^3$  ( $p=0,576$ ) (B); Número de mutações entre os pacientes do sexo feminino e masculino ( $p > 0,05$ ) (C); e carga tumoral ( $p=0,210$ ) entre os pacientes femininos e masculinos (D). Os resultados foram analisados por teste de comparação Teste T, considerando  $p < 0,05$ .

Entre os pacientes, 8 foram acometidos por invasão angiolinfática, enquanto 12 não tiveram invasão. Entre estes grupos, não houve diferença em relação ao número de mutações ( $p=0,296$ ). Os pacientes com CEA >5 ng/mL não apresentaram diferença em relação ao TMB. Também não houve diferença entre os grupos em relação ao volume tumoral.

Foi observada associação significativa entre carga TMB e níveis de CEA <5ng/mL , com destaque para o fato de que pacientes com TMB < 5mut/Mb, apresentaram CEA elevado ( $\geq 5$ ng/mL) em 91% dos casos ( $p= 0,0045$ ). Esses dados sugerem que a carga mutacional pode estar inversamente relacionada à secreção desse marcador tumoral, indicando potenciais diferenças no comportamento biológico entre os subgrupos, ou seja, tumores com TMB elevado podem apresentar menor secreção de CEA, ou serem de linhagens diferentes. Alternativamente, tumores com TMB baixo e CEA alto podem representar fenótipos mais agressivos, com comportamento biológico distinto entre os pacientes com CEA abaixo de 5ng/mL e TMB acima de 5 mut/Mb (Figura 17).

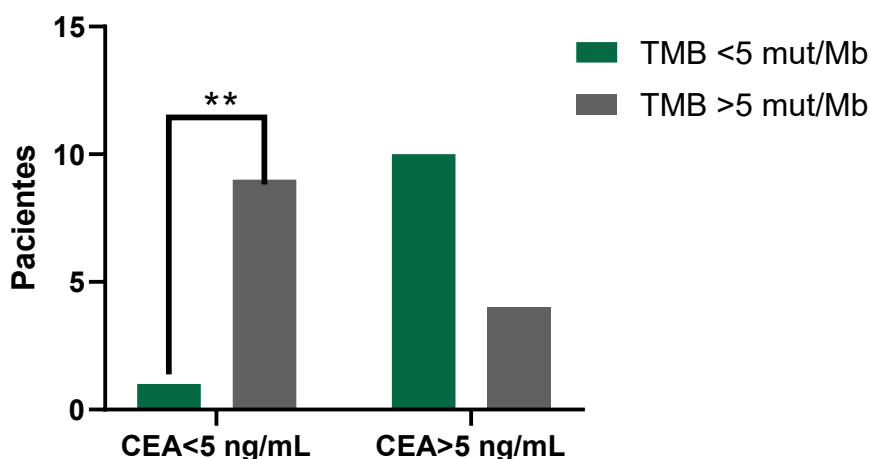


Figura 17: Associação de valores dicotomizados de CEA e TMB, demonstrando forte relação negativa entre estes dois marcadores ( $p=0,0045$ , Fisher).

Cerca de 70% dos pacientes acima de 60 anos possuem IMC abaixo de 25kg/m<sup>3</sup>, e dentro do grupo de pacientes mais jovens (<60 anos), 55,56% possuem IMC abaixo de 25kg/m<sup>3</sup>, com apenas 1 caso de paciente com IMC acima de 30. Entre os grupos, não houve associações relevantes de pacientes. Em geral, os pacientes dos sexos feminino e masculino, tiveram número de mutações acima de 10 (54,85% e 63,54%), e não houve significância estatística ( $p= 0,696$ ). Análise de volume tumoral em pacientes com invasão angiolinfática demonstrou que 72,73% deles possuem um volume tumoral acima de 45 cm<sup>3</sup>, porém não foi constatado relevância significativa ( $p=0,4003$ ).

Em suma, 61,54% dos pacientes do sexo feminino tiveram maior elevação de CEA (>5ng/mL), em relação aos homens ( $p > 0,999$ ). Entre estes grupos, pouco mais da metade dos pacientes do sexo feminino tiveram invasão angiolinfática (55,56%) em comparação ao grupo masculino onde houve igual distribuição de acometimento angiolinfático (50%).

Em relação à terapia neoadjuvante, não foi possível determinar a relação de efeito da terapia com qualquer dado clínicos dos três pacientes ( $P > 0,05$ ). Entretanto, entre os 20 pacientes que não realizaram terapia neoadjuvante, o TMB foi ligeiramente menor, com 52,38% destes com carga tumoral (TMB) abaixo de 5 mut/Mb. Em contrapartida, dos 3 pacientes que realizaram neoadjuvante, 100% tiveram carga de TMB abaixo de 5 mut/Mb, porém sem significância estatística ( $p=0,239$ ).

#### 4.6- COOCORRÊNCIA DE MUTAÇÕES

Determinados genes tendem a sofrer alterações em conjunto dentro de um mesmo paciente, o que pode indicar interação funcional ou pertencimento a vias moleculares comuns. Em geral, a distribuição de todas as mutações em conjunto, tiveram aspecto homogêneo, O CBL 36, CBL 62, CBL72, CBL83 com mutações no *CYP2D6* e *APC* em conjunto, e apesar de teste estatístico sem associação ( $p=0,532$ ), 100% das alterações do *CYP2D6* ocorreram em conjunto com o *APC*. Enquanto isso, apenas o CBL 24 sofreu alteração e *NPY* com *APC*, *NQO1* e *TP53* ( $p > 0,05$ ) (Figura 18).

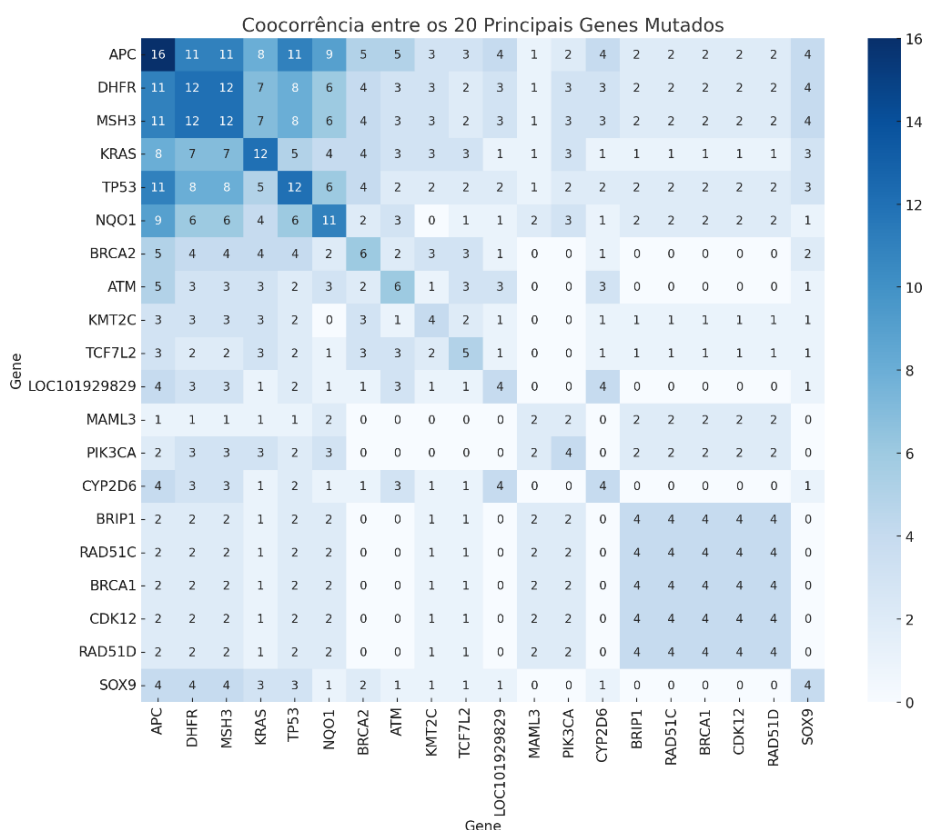


Figura 18: Heatmap com os 20 genes mais mutados e suas respectivas co-ocorrência entre eles. Onde os genes com maior frequência de correlação estão representados no canto superior esquerdo.

Curiosamente, os CBL102a e CBL102b não demonstraram o mesmo padrão de mutação, apesar de serem sincrônicos. Como por exemplo a ausência de mutação no APC do CBL102a, e outros genes como *GNAS*, *TCF7L2* que não foram encontrados nas amostras dos mesmos pacientes.

Em dois pacientes foram identificados coocorrência em *DHFR*, *MSH3* com *BRCA1* ( $p > 0,999$ ), sendo ambas classificadas como MSI-Immune (CMS1), responsável por reparo de DNA por recombinação homóloga. Essas alterações são alvos estratégicos para terapias com inibidores de Poly (ADP-ribose) polymerasePARP, que hoje são efetivos em cânceres com mutação no *BRCA1* como olaparib, rucaparib e nirapatib (70).

Foram filtrados os 20 principais genes e suas coocorrências (Figura 19). Dentre eles, 10 genes tiveram o maior desempenho de correlação. Evidencia-se uma concentração de ocorrências entre 5 genes, com maior destaque ao gene APC, acometendo 16 pacientes. Observou-se coocorrência estatisticamente

significativa entre as mutações *APC* e *TP53* como demonstrado na figura 19A ( $p=0,0094$ ), com um odds ratio de 19,25, indicando que pacientes com mutações em *APC* apresentaram chance 19 vezes maior de também possuírem mutações em *TP53* em comparação com aqueles sem mutação no *APC*. Isso sugere possível sinergismo molecular ou via comum de seleção tumoral envolvendo esses e genes. Embora tenha sido observada coocorrência e associação significativa entre as mutações em *APC* e *TP53*, a análise de correlação entre suas frequências alélicas percentuais não atingiu significância estatística ( $r=0,306$   $p=0,3328$ , Pearson), possivelmente devido à variabilidade entre os pacientes e ao número limitado de amostras. Esses achados sugerem que, embora as mutações ocorram frequentemente em conjunto, a intensidade de suas cargas de frequência alélica pode não evoluir de forma paralela.

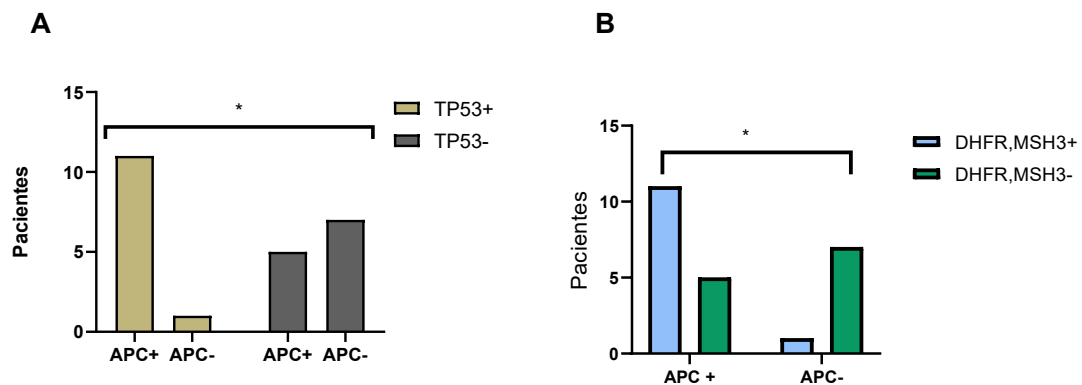


Figura 19: Associação de teste exato de Fisher entre amostras dicotomizadas de *APC* e *TP53*.

Associação com alta significância estatística,  $p=0,0094$ ; odds ratio: 19,25; IC95%: 1,66 – 231,4.

Foi observada coocorrência significativa entre *APC* e *DHFR,MSH3* ( $p=0,0272$ ), com um odds ratio estimado de 15,4 (Figura 19 B). Esses achados indicam que pacientes com mutações em *DHFR,MSH3* apresentam chance substancialmente aumentada de também possuírem mutações em *APC*. Tal associação não foi refletida na análise de correlação entre frequências alélicas, sugerindo que a intensidade mutacional pode não evoluir de forma paralela, embora ocorra simultaneamente em muitos casos.

O *APC* e *KRAS* aparecem em 8 pacientes em conjunto, e o teste exato de Fisher não demonstrou relação entre os casos ( $p=0,647$ ). Isso indica que, apesar

da tendência numérica indicar alta frequência de mutações *KRAS* entre os casos positivos de *APC* (8/16), a ocorrência entre essas alterações genéticas não revelou informações estatisticamente relevantes. Com isso, sugere-se que, nesta coorte, as mutações de *KRAS* e *APC* podem ocorrer de forma independente, reforçando a heterogeneidade molecular dos tumores colorretais. Concomitantemente à associação entre *APC* e *NQO1*, que demonstrou uma tendência de coocorrência entre mutações entre os genes (QR=3,86), essa associação não foi estatisticamente significativa na análise por Fisher ( $p=0,2108$ ), o que sugere que a presença simultânea dessas alterações pode ocorrer de forma aleatória na coorte presente.

Entre o restante dos principais genes não foi encontrado associações positivas significativa entre as amostras. Os genes *DHFR,MSH3* e *KRAS* apareceram em conjunto em 58,33% dos casos ( $p=0,684$ ); *DHFR,MSH3* com *TP53* são coocorrentes em 66,67% dos pacientes ( $p=0,2203$ ), o mesmo para *DHFR,MSH3* e *NQO1*, que apresentaram coocorrência equilibrada entre esses dois genes, ou seja, entre os 12 pacientes com mutações em *DHFR,MSH3*, 50% deles ocorrem simultaneamente nos dois genes ( $p> 0,999$ ).

Com isso, é possível determinar que a coocorrência entre os genes *APC* e *TP53*, e *APC* e *DHFR,MSH3*, possuem forte interação associativa entre eles. O acúmulo de alterações nas vias de reparo de DNA (*DHFR,MSH3*), junto com mutações em genes de supressão tumoral responsáveis pelo controle homeostático da via Wnt/ $\beta$ -catenina (*APC*) e perda de função supressora (*TP53*), adquirem uma função pró tumoral descontrolada, associando vários fatores tumorais que contribuem para uma progressão tumoral mais agressiva e com pior prognóstico para o paciente.

O *APC/DHFR,MSH3* ( $r=0,921$ ,  $p<0,05$ ) e *APC/NQO1* ( $r=0,829$ ,  $p=0,003$ ) com forte correlação estatística, e correlação moderada nos perfis *APC/KRAS* ( $r=0,602$ ,  $p= 0,066$ ) e *KRAS/DHFR, MSH3* ( $r=0,667$ ,  $p= 0,035$ ). Esses padrões sugerem que mutações nestes genes podem estar associadas a subtipos específicos de tumores, com possível impacto em progressão tumoral ou resposta a terapias.

#### 4.5- CORRELAÇÕES CLÍNICAS E GENÉTICAS

Após a caracterização dos principais genes mutados na coorte, torna-se relevante explorar não apenas a presença ou ausência dessas alterações, mas também o seu grau de impacto molecular. Nesse contexto, a frequência alélica (variant allele frequency, VAF) surge como um parâmetro adicional que pode refletir a carga tumoral, o grau de representatividade da mutação na população celular tumoral e sua relevância biológica. A partir disso, foram conduzidas análises de correlação entre a VAF dos principais genes selecionados e variáveis genéticas e clínicas, com o objetivo de investigar possíveis associações entre intensidade mutacional e comportamento tumoral, como níveis séricos de CEA, estadiamento e volume tumoral. Esse enfoque visa aprofundar a compreensão da heterogeneidade genômica dentro da própria coorte e identificar marcadores que possam ter valor prognóstico ou preditivo.

Na presente análise, avaliou-se a correlação entre a frequência alélica das mutações no gene APC e os níveis séricos do marcador tumoral CEA. Embora a análise geral com todos os pacientes mutados em *APC* não tenha atingido significância estatística ( $p = 0,0961$ ), observou-se uma tendência de associação ( $r = 0,612$ ), sugerindo que o aumento da frequência alélica poderia estar relacionado ao aumento nos níveis de CEA (Figura 20A). Notavelmente, ao restringir a análise aos pacientes com CEA elevado ( $>5$  ng/mL), evidenciou-se uma forte correlação positiva entre as variáveis ( $r = 0,9286$ ;  $p = 0,0022$ ), indicando que a carga mutacional de *APC* pode contribuir para alterações no perfil de secreção tumoral (Figura 20B). A regressão linear apresentou bandas de confiança estreitas ao redor da linha de tendência, evidenciando a robustez da correlação entre a frequência alélica de APC e os níveis séricos de CEA. Essa configuração gráfica indica baixa dispersão dos dados, reforçando a confiabilidade da tendência observada. Essa relação aponta para um potencial impacto biológico entre a intensidade da mutação e a atividade metabólica tumoral refletida no CEA. Apesar disso, o tamanho da amostra e a natureza exploratória da análise indicam a necessidade de validação em coortes maiores. Na análise de correlação Spearman, não foi observada associação significativa entre a frequência alélica de *APC* e carga TMB ( $p = 0,837$ ;  $r = 0,073$ ) (Figura 20 C). Como também a frequência alélula e o número de mutações encontradas em

cada paciente, onde não houve correlação significativa ( $p=0,838$ ,  $r=0,0554$ ) (Figura 20 D). Esse resultado reforça a noção de que, embora *APC* seja um dos genes mais frequentemente mutados no CCR, sua frequência alélica não acompanha diretamente o nível de instabilidade genômica tumoral. Tais achados sugerem que mutações em *APC* ocorrem de forma independente de processos que levam ao acúmulo global de mutações somáticas.

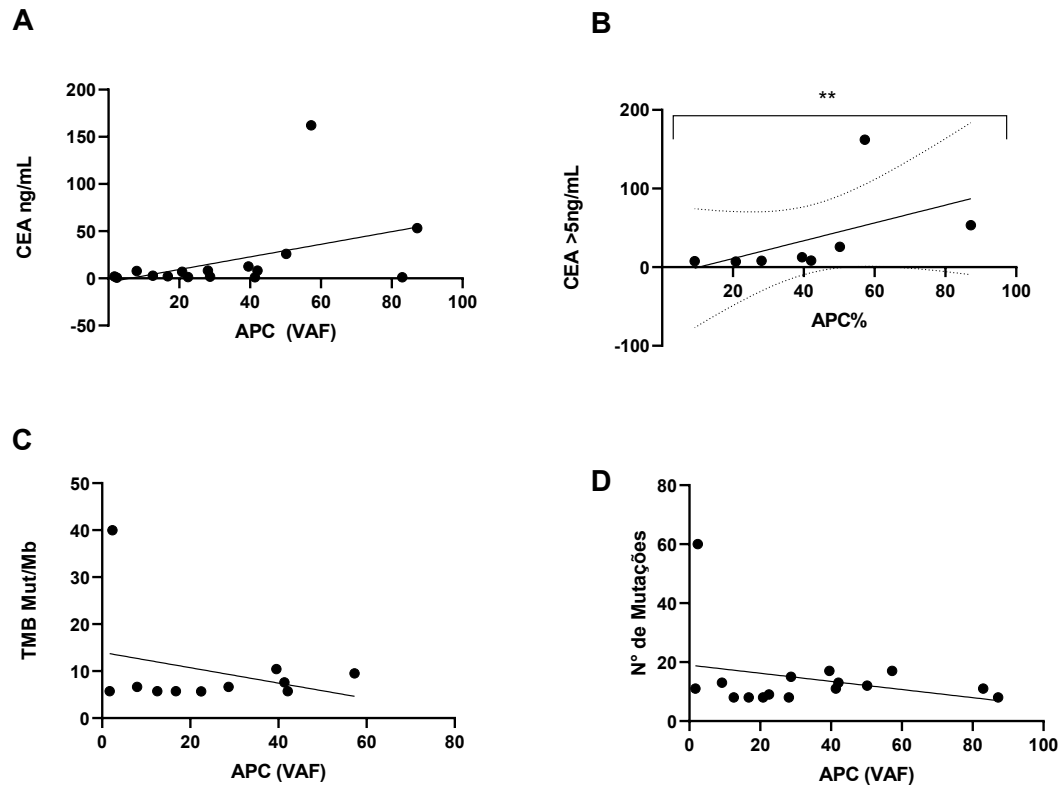


Figura 20: Correlação entre níveis de CEA com frequência alélica de *APC*, demonstrando baixa correlação ( $p=0,0961$ ;  $r=0,612$ ) (A). Forte correlação positiva da frequência alélica de *APC* com CEA acima de 5ng/mL IC95% ( $p=0,002$ ;  $r=0,9286$ , Spearman) (B). Análise de correlação de VAF com TMB  $p=0,837$ ;  $r=0,073$ ) (C) e com o número de mutações neste gene ( $p=0,838$ ;  $r=0,0554$ ) (D).

O *APC* atua na via Wnt e, embora seja mutado precocemente no CCR, não está diretamente ligado a falhas em reparo de DNA que geram múltiplas mutações, diferentemente do *TP53*, por exemplo, ou genes do sistema MMR

Em seguida, foi analisado o VAF dos pacientes com *KRAS* positivo com o CEA, onde demonstrou correlação positiva significativa ( $p=0,0019$ ;  $r=0,816$ ) (Figura 21A). Ao restringir a análise para os pacientes com CEA >5ng/mL, essa correlação deixa de existir ( $p=0,153$ ;  $r=0,562$ ) (Figura 21B). A perda de

significância ao considerar apenas pacientes com CEA elevado sugere que a correlação entre a frequência alélica de *KRAS* e os níveis de CEA se deve mais à variação entre níveis baixos e altos de CEA do que à variabilidade dentro do grupo com CEA elevado. Ou seja, embora haja uma tendência geral de associação entre maior VAF de *KRAS* e níveis elevados de CEA, esse padrão se desfaz em um subgrupo já homogêneo. Esse achado ressalta a importância de considerar o contexto clínico dos marcadores tumorais na interpretação de correlações moleculares, pois estratificações excessivas podem reduzir a variabilidade e o poder estatístico. Ainda assim, a correlação moderada observada no grupo com CEA elevado ( $r = 0,562$ ) pode refletir uma tendência biológica, embora não estatisticamente robusta neste subconjunto limitado.

A frequência alélica do *KRAS* não teve correlação com a carga mutacional total (TMB), ( $p=0,247$ ), apesar de demonstrar fraca correlação negativa ( $r=-0,360$ ) (Figura 21C). Ao restringir a análise para TMB >5 mut/Mb, a correlação negativa fraca se manteve, ainda sem significância estatística relevante ( $p=0,6615$ ;  $r = -0,2143$ ) (Figura 21D).

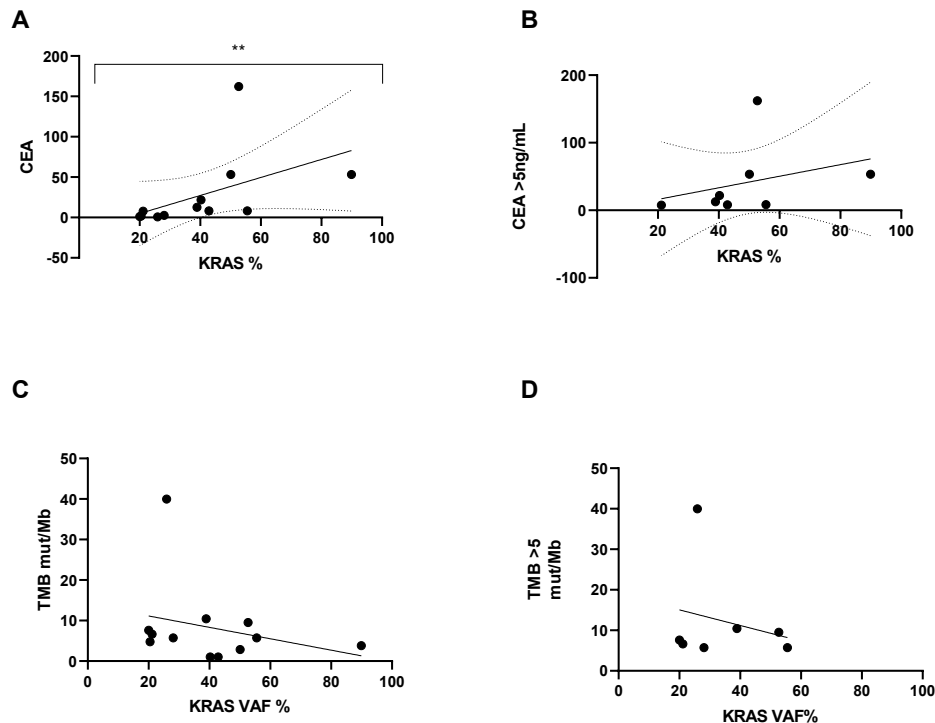


Figura 21: Análise de correlação entre o gene *KRAS* com dados clínicos e genéticos. Correlação de *KRAS* com CEA ( $p=0,0019$ ;  $r=0,816$ ) (A). Análise de correlação entre *KRAS* e dados de CEA dicotomizados (>5ng/mL) ( $p=0,153$ ;  $r=0,562$ ) (B). Correlação entre frequência

alélica do KRAS com TMB ( $p=0,247$ ;  $r=0,360$ ) (C). Correlação entre frequência alélica do KRAS com TMB dicotomizado  $>5\text{mut/Mb}$  ( $p=0,6615$ ;  $r=-0,2143$ ) (D).

Considerando o papel funcional de *DHFR* como enzima-chave na síntese de nucleotídeos, sua mutação pode representar alterações metabólicas significativas no contexto tumoral. Apesar de não ser tradicionalmente um dos principais genes mutados no câncer colorretal, a presença consistente de alterações em *DHFR*, *MSH3* observada na coorte, especialmente em associação com APC, levanta a hipótese de impacto funcional relevante.

Com isso, foram feitas análises de correlações de Spearman entre os pacientes com *DHFR*, *MSH3* positivos e os resultados genéticos. A fim de aprofundar essa caracterização, foram realizadas análises de correlação com marcador clínico como níveis séricos de CEA, avaliação da frequência alélica (VAF) e valor de TMB, buscando investigar possíveis correlações entre intensidade mutacional e comportamento tumoral envolvendo *DHFR* e *MSH3*. Esses testes visam esclarecer se mutações nesse gene estão associadas a padrões clínicos ou moleculares distintos, e contribuir para a compreensão de subgrupos genômicos potencialmente relevantes dentro da amostra analisada.

Inicialmente a correlação entre a frequência alélica do gene com carga tumoral TMB não revelou relação significativa ( $p=0,363$ ;  $r=0,286$ ) (Figura 22A), bem como sua dicotomização em TMB  $>5$  mutações por megabase ( $p=0,566$ ;  $r=-0,221$ ) (Figura 22B).

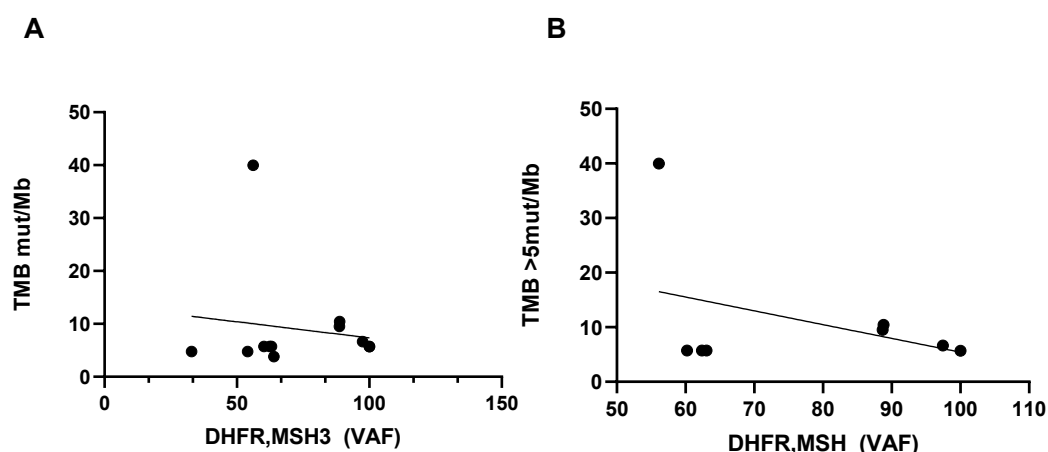


Figura 22: Gráfico de correlação de pacientes com mutações nos genes *DHFR*, *MSH3* e a carga tumoral TMB. Demonstrando que não houve correlação significativa entre o grupo TMB total ( $p=0,363$ ;  $r=0,286$ ) e o grupo com valor de TMB restrito a  $>5$  mut/Mb ( $p=0,566$ ;  $r= -0,221$ , Spearman).

Esses resultados sugerem que, neste conjunto de pacientes, a frequência alélica do gene, não se associa de maneira robusta à carga mutacional total da neoplasia, medida por TMB. A ausência de correlação significativa, tanto na análise contínua ( $p= 0,363$ ;  $r= 0,286$ ) quanto após a dicotomização do TMB com ponto de corte  $>5$  mutações/megabase ( $p = 0,566$ ;  $r= -0,221$ ), indica que a intensidade da mutação detectada no gene não acompanha diretamente o nível global de instabilidade genômica ou o número total de variantes somáticas. Além disso, a correlação entre VAF e número de mutações também não demonstrou significância estatística ( $p=0,9535$ ;  $r=0,01950$ ). Essa independência pode refletir o fato de que, embora *DHFR*, *MSH3* apresente mutações com frequência considerável, sua contribuição genômica ocorre de forma isolada e não se integra às vias associadas ao acúmulo de mutações genômicas mais amplas, como aquelas observadas em genes de reparo de DNA.

Na presente coorte, *TP53* foi um dos genes mais frequentemente mutados, o que está em conformidade com a literatura, que aponta sua alteração em aproximadamente 50% dos tumores humanos. A fim de compreender o impacto funcional dessas mutações, além das análises de coocorrência com outros genes, foram feitas correlações entre VAF de *TP53* e marcadores clínicos, como CEA, TMB, e número de mutações, buscando identificar possíveis associações entre a intensidade mutacional e o comportamento tumoral.

A análise de correlação entre VAF e CEA não demonstrou resultados estatisticamente significativos ( $p=0,470$ ;  $r=0,230$ ) (Figura 23A), bem como sua dicotomização em CEA  $>5$ ng/mL ( $p=0,9378$ ;  $r= -0,0621$ ) (Figura 23B). Entretanto, foi observada correlação positiva significativa entre a frequência alélica da mutação em *TP53* e a carga tumoral TMB ( $p= 0,0252$ ;  $r=0,639$ ) (Figura 23C) indicando que tumores com maior proporção de alelos mutados tendem a apresentar carga genômica mais elevada. Aproximadamente 41% da variação da TMB pode ser atribuída à variação de VAF e *TP53*, reforçando o papel potencial desse gene como marcador de instabilidade genômica do CCR. Além disso, forte correlação positiva foi identificada entre o número de mutações e

VAF de *TP53* ( $p=0,0009$ ;  $r=0,825$ ), sendo 68% das variações do número de mutações é explicada pelo VAF (Figura 23D).

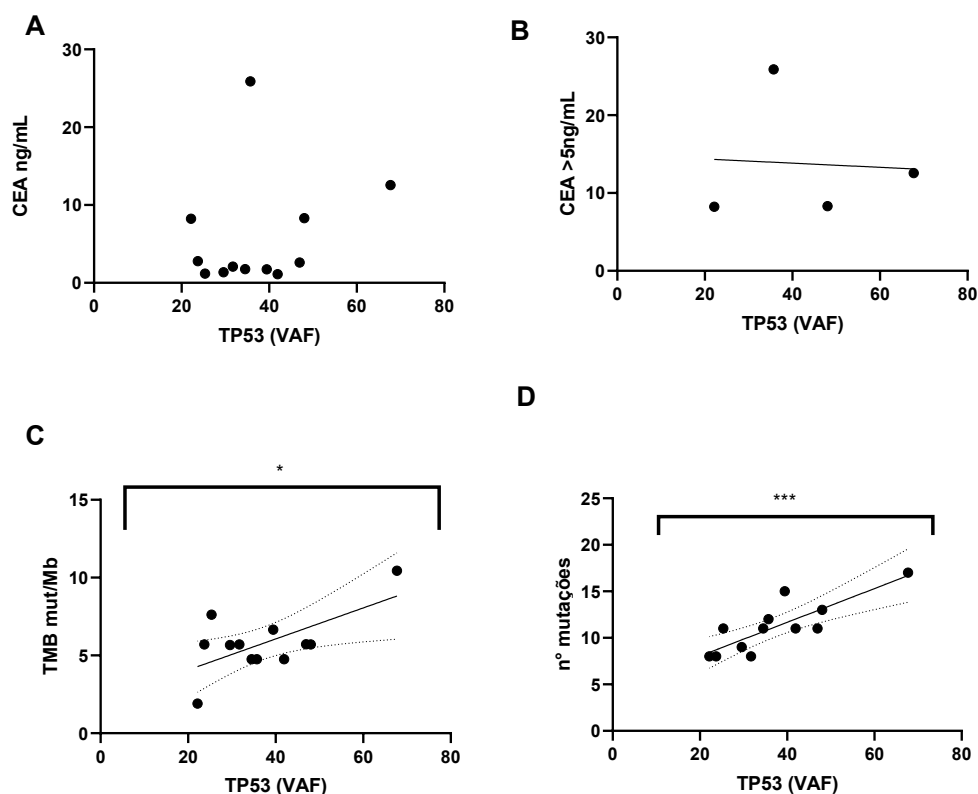


Figura 23: Análise de correlação entre VAF de *TP53* com dados clínicos CEA (A) ( $p=0,470$ ;  $r=0,230$ , Spearman), e CEA acima de 5 ng/mL ( $p=0,937$ ;  $r=-0,0621$ , Spearman)(B). Correlação positiva em VAF de *TP53* com TMB ( $P=0,285$ ;  $r=-0,283$ , Spearman) (C). Correlação entre valores de frequência alélica de *TP53* com número de mutações ( $p=0,0009$ ;  $r=0,825$ ;  $r^2=0,681$ , Pearson) (D).

A correlação de Spearman não demonstrou resultados significativos entre VAF de *TP53* com TMB ( $p=0,285$ ;  $r=-0,283$ ) com fraca correlação negativa, evidenciando que, neste conjunto de pacientes, o grau de mutação de *TP53* não se relaciona diretamente com o número global de alterações genômicas. Esse achado sugere que, embora mutações em *TP53* sejam comuns e precoces no CCR, sua frequência alélica não reflete o nível de instabilidade genômica do tumor, ao contrário do observado com

É possível então que o tamanho limitado das amostra tenha comprometido a detecção de associações e correlações sutis, apontando para a necessidade de validação em coortes maiores ou subgrupos moleculares mais homogêneos.

Outra correlação encontrada com o marcador CEA, foi a dicotomização do CEA >5ng/mL em relação ao volume do tumor (cm<sup>3</sup>), o que demonstrou uma correlação positiva significativa entre elas ( $p=0,0402$ ;  $r=0,581$ , spearman) (Figura 24A). Ao que parece, o volume do tumor pode ser influenciado pelo marcador CEA, e em alguns casos, os pacientes com grande volume tumoral, apresentaram valores elevados de CEA (>50ng/mL), como a tabela 0. Entretanto, não houve correlação estatística significativa ( $p>0,05$ ), uma vez que o CBL72, por exemplo, obteve um dos maiores volumes tumorais (73,73cm<sup>3</sup>), enquanto o valor de CEA permaneceu abaixo de 1ng/mL (Figura 24B) Além disso, apesar do volume tumoral influenciar diretamente o preenchimento da luz intestinal, não houve correlação significativa entre eles ( $p=0,6638$ ).

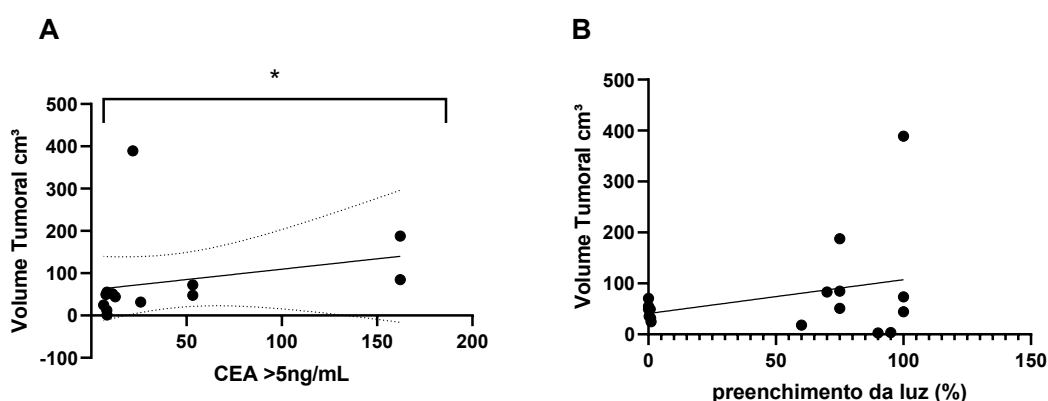


Figura 24: Análise de correlação entre pacientes com CEA acima de 5ng/mL e o volume tumoral em cm<sup>3</sup>. Os 14 pacientes analisados tiveram um perfil de correlação de  $r=0,696$  com grande significância estatística ( $p=0,0072$ ). Notam-se outliers como o CBL 18 com 389,1 cm<sup>3</sup> de volume tumoral (A). A análise de correlação demonstrou que não houve relação entre preenchimento intestinal e o volume do tumor ( $P=0,6638$ ;  $r=0,1136$ ) (B).

Apesar da expectativa de correlação direta entre volume tumoral e obstrução intestinal, os dados demonstram que essa relação é heterogênea e depende de vários fatores, especialmente entre pacientes com níveis elevados

de CEA (Tabela 2). A análise reforça a necessidade de uma abordagem individualizada, considerando não apenas o volume, mas também a morfologia e topografia tumoral. Esses achados destacam a importância de integrar dados radiológicos e moleculares na avaliação clínica de pacientes com câncer colorretal avançado

Tabela 2: Relação do volume tumoral com a obstrução intestinal em pacientes com CEA elevado

| ID     | CEA >50 ng/mL | Volume Tumoral cm <sup>3</sup> | Preenchimento da Luz (%) |
|--------|---------------|--------------------------------|--------------------------|
| CBL9   | 8,18          | 51,18                          | 75                       |
| CBL18  | 11,12         | 389,1                          | 100                      |
| CBL26  | 21,86         | 44,26                          | 100                      |
| CBL 42 | 12,56         | 49,53                          | 0,7                      |
| CBL 53 | 8,31          | 31,67                          | 0,9                      |
| CBL 62 | 61,26         | 24,66                          | 1                        |
| CBL 83 | 7,72          | 27,12                          | 0                        |
| CBL9   | 25,89         | 72,28                          | 75                       |
| CBL18  | 7,08          | 47,55                          | 100                      |
| CBL26  | 8,23          | 51,18                          | 100                      |
| CBL 42 | 162,2         | 389,1                          | 0,7                      |
| CBL 53 | 162,2         | 44,26                          | 0,9                      |
| CBL 62 | 53,3          | 49,53                          | 1                        |
| CBL 83 | 53,3          | 31,67                          | 0                        |

#### 4.7. POTENCIAIS GENES CANDIDATOS

Dentre os pacientes inseridos na coorte, apenas o CBL34 apresentou mutação em todos os 5 principais genes. Em geral, três pacientes tiveram mutações nos 3 principais genes (*APC*, *DHFR*, *MSH3* e *KRAS*). Apenas dois pacientes não tiveram mutações nos principais genes (CBL9 e CBL46).

Dentro da nossa coorte, o gene *NQO1* possui uma grande particularidade que é a exclusividade de mutação única em metade dos pacientes. Este gene, de acordo com bancos de dados mundiais (cBIO, OncoKB) aparece com uma frequência extremamente baixa entre os pacientes com câncer de cólon e reto (<1%). Em uma análise de genes mutados no CCR através do cBIO, 1.948

amostras de cólon analisadas demonstraram os principais genes com alta frequência de aparecimento. Entre eles, o *APC* aparece em primeiro lugar com 63,80% de frequência de aparecimento igual em cólon e reto. Em segundo lugar o *TP53*, seguido do *TTN*, *KRAS* e *SYNE1* para cólon, em comparação com amostras de reto onde o *KRAS* ocupa o terceiro lugar, seguido do *FBXW7* e *PI3KCA* (Tabela 3).

Em comparação com nossa coorte, o *APC*, *KRAS* e *TP53* também aparecem entre os 5 principais genes, entretanto, os genes *DHFR*, *MSH3* e *NQO1* aparecem em nossa coorte com frequência relevante, especialmente quando comparado à coorte de amostras do cBIO que classificou o gene *MSH3* com 5,8% de frequência de ocorrência, e o *DHFR* não apareceu nas análises, ou seja, possui frequência de aparecimento inferior a 5%.

Tabela 3: Principais mutações em coorte de 1.948 amostras de cólon e 1.060 de reto inseridas no portal cBIO

| Principais Mutações - cBIO |       | Principais Mutações- Coorte Atual |       |
|----------------------------|-------|-----------------------------------|-------|
| Cólon                      |       |                                   |       |
|                            | %     |                                   | %     |
| APC                        | 63,8  | APC                               | 56,25 |
| TP53                       | 58    | DHFR,MSH3                         | 56,25 |
| TTN                        | 47,5  | KRAS                              | 43,75 |
| KRAS                       | 39,,5 | TP53                              | 43,75 |
| SYNE1                      | 27,4  | NQO1                              | 37,5  |
| Reto                       |       |                                   |       |
|                            | %     |                                   | %     |
| APC                        | 79,7  | APC                               | 50    |
| TP53                       | 78,5  | KRAS                              | 31,25 |
| KRAS                       | 42,4  | TP53                              | 31,25 |
| FBXW7                      | 19,5  | NQO1                              | 31,25 |
| PIK3CA                     | 14,0  | DHFR,MSH3                         | 18,75 |

Fonte: CERAMI, Ethan et al. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discovery*, v. 2, n. 5, p. 401–404, maio 2012. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-12-0095

O gene *NQO1*, por estar presente em 50% a nossa coorte, é destacado como um dos mais importantes devido a sua exclusividade de ocorrência e sua

frequência de aparecimento entre a população do estudo. Em geral, observou-se uma correlação significativa entre a carga mutacional TMB e o número de mutações em pacientes com expressão positiva do gene *NQO1* ( $p=0,0052$ ;  $r=0,791$ ) (Figura 25).

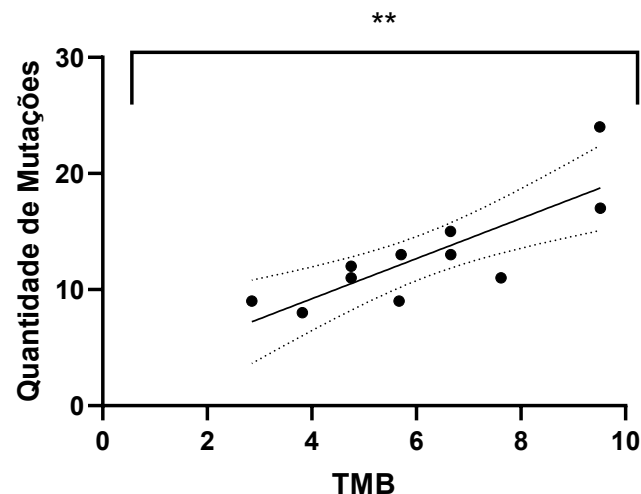


Figura 25: Correlação positiva entre número de mutações e a carga tumoral TMB encontrada em cada paciente ( $p=0,0052$ ;  $r=0,7913$ ).

Outra análise de correlação, demonstrou uma correlação negativa da frequência alélica dos pacientes positivos para *NQO1* com os valores séricos de CEA ( $p=0,0112$ ;  $r= -0,7443$ ) (Figura 26A), e de VAF e grau de diferenciação celular da histopatologia ( $p=0,0265$ ;  $r= -0,6703$ ) (Figura 26B), demonstrando que há uma relação inversamente proporcional a esses valores. Ou seja, quanto maior a frequência alélica da mutação, menos será o grau de diferenciação celular, resultando em um tumor mais agressivo, mostrando que, os 6 pacientes de grau 1 de diferenciação, possuem o tecido tumoral muito diferenciado em relação ao tecido saudável com pior prognóstico clínico.

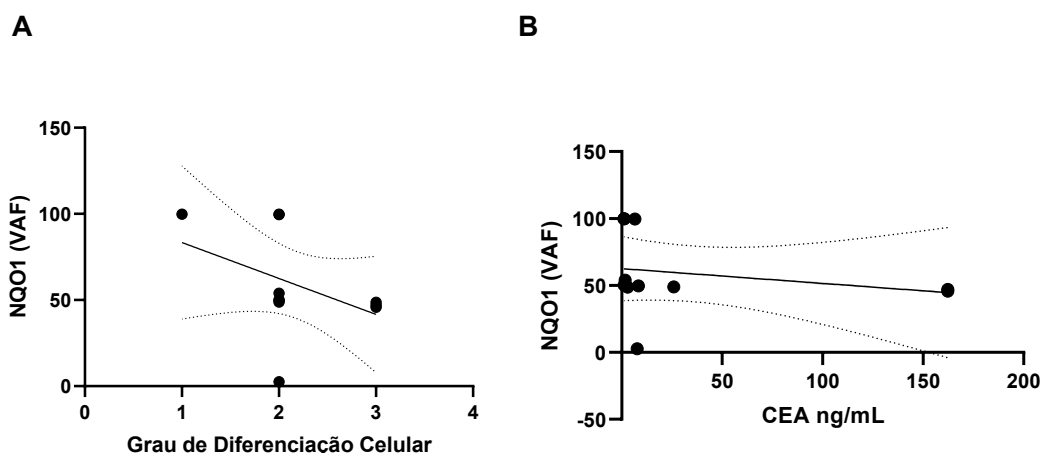


Figura 26: (A) Correlação negativa entre frequência alélica de NQO1 e grau de diferenciação celular ( $p=0,0265$ ;  $r=-0,6703$ ). (B) Correlação negativa encontrada entre os 11 pacientes ( $p=0,00112$ ;  $r=-0,7443$ ).

Por fim, este gene está associado a biologia tumoral do CCR através da codificação de enzimas envolvidas na detoxificação de quinonas e na proteção contra estresse oxidativo, atuando como um importante componente da defesa celular frente a danos no DNA. Em tumores colorretais, sua expressão tem sido associada a alterações no microambiente tumoral, à instabilidade genômica e à modulação da resposta a agentes quimioterápicos. Mutações neste gene podem desencadear alterações nas principais vias envolvidas na carcinogênese de neoplasias.

A expressão positiva do gene *NQO1* mostrou correlação significativa com carga tumoral TMB e quantidade de mutações por paciente, apesar de não haver diferença significativa ( $p=0,239$ , Fisher) entre os pacientes com *NQO1* positivo e negativos em relação ao número de mutações. Esse gene pode estar relacionado a um perfil genético mais instável e potencialmente mais imunogênico. Isso reforça a hipótese de que o *NQO1* pode ser explorado não apenas como um biomarcador prognóstico, mas também como possível alvo terapêutico ou preditor de resposta a imunoterapia, mostrando assim sua relevância no CCR por integrar aspectos genéticos, funcionais e clínicos, contribuindo para uma compreensão mais abrangente da heterogeneidade tumoral e para o avanço da medicina personalizada nesse tipo de câncer.

Diante dos achados apresentados, evidencia-se que o gene *NQO1* emerge como um elemento-chave na compreensão da heterogeneidade molecular do câncer colorretal na coorte analisada. Sua participação na regulação do estresse oxidativo e no metabolismo de quinonas aponta para um papel protetivo em células normais, mas paradoxalmente pode favorecer a sobrevivência de células tumorais em microambientes hostis. A associação observada entre a expressão positiva de *NQO1* e uma maior carga mutacional tumoral (TMB) sugere uma possível conexão com a instabilidade genômica e o potencial imunogênico desses tumores, aspectos cada vez mais relevantes na era da oncologia de precisão. Assim, o *NQO1* não apenas se configura como um marcador promissor de prognóstico, mas também como alvo potencial de intervenções terapêuticas, reforçando sua importância no contexto translacional e clínico do CCR.

## 5. CONCLUSÃO

O presente estudo teve como objetivo caracterizar, por meio de sequenciamento de Nova Geração (NGS), o perfil mutacional de pacientes com câncer colorretal, utilizando amostras frescas e congeladas em sequência, o que garantiu elevada integridade do material genético e confiabilidade dos resultados obtidos. A padronização dos processos de coleta, armazenamento e análise molecular permitiu a identificação precisa dos principais genes alterados na população estudada.

Dentre os genes com maior frequência de mutações, destacaram-se *APC*, *KRAS*, *TP53*, *DHFR*, *MSH3* e *NQO1*. A análise de coocorrência revelou que essas alterações tendem a ocorrer simultaneamente em determinados pacientes, sugerindo uma possível sinergia entre vias de sinalização oncogênicas e mecanismos de instabilidade genômica, o que pode contribuir para um fenótipo tumoral mais agressivo e de pior prognóstico.

O gene *APC*, frequentemente mutado em CCR, atua como regulador negativo da via Wnt e sua inativação promove proliferação celular descontrolada. Já o *KRAS*, um oncogene clássico, está envolvido em cascatas de sinalização como MAPK e *PI3K*, sendo suas mutações associadas à resistência a terapias anti-EGFR e à progressão tumoral. O *TP53*, por sua vez, é um supressor tumoral

crucial na resposta ao dano ao DNA, e sua mutação compromete a apoptose e o controle do ciclo celular. O gene *DHFR*, envolvido na síntese de nucleotídeos, pode estar relacionado à resistência a agentes inibidores da síntese de DNA e RNA. Já *MSH3*, componente do sistema de reparo por incompatibilidade de pares de bases (MMR), quando mutado, contribui para a instabilidade de microsatélites (MSI), um marcador importante em subtipos de CCR, e nestes genes ocorreu uma fusão dessas variantes, devido a uma mutação na extremidade final de um deles, à extremidade inicial do outro. Por fim, *NQO1*, além de seu papel na defesa antioxidante, mostrou-se correlacionado com maior carga mutacional tumoral (TMB), sugerindo possível relevância como biomarcador imunológico.

Esses achados reforçam a importância de se estabelecer um perfil genético populacional do CCR, especialmente em países como o Brasil, onde a diversidade genética e os fatores ambientais como dieta, obesidade e hábitos de vida, influenciam diretamente o padrão de mutações somáticas. A identificação de assinaturas moleculares específicas pode não apenas aprimorar o prognóstico e a estratificação de risco, mas também orientar decisões terapêuticas mais precisas, contribuindo para o avanço da oncologia personalizada no cenário nacional.

## 6. REFERÊNCIAS

1. Morgan E, Arnold M, Gini A, Lorenzoni V, Cabasag CJ, Laversanne M, et al. Global burden of colorectal cancer in 2020 and 2040: incidence and mortality estimates from GLOBOCAN. *Gut*. fevereiro de 2023;72(2):338–44.
2. Cronin KA, Ries LAG, Edwards BK. Preface. *Cancer*. dezembro de 2014;120(S23):3755–7.
3. MINISTÉRIO DA SAÚDE. ESTIMATIVA 2023 Incidência de Câncer no Brasil [Internet]. Rio de Janeiro; 2022 [citado 7 de junho de 2025]. (Instituto Nacional de Câncer (INCA)). Disponível em: <http://www.inca.gov.br>
4. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. junho de 1990;61(5):759–67.
5. Bodmer WF, Bailey CJ, Bodmer J, Bussey HJR, Ellis A, Gorman P, et al. Localization of the gene for familial adenomatous polyposis on chromosome 5. *Nature*. agosto de 1987;328(6131):614–6.

6. Lisa A. Urry, Michael L. Cain, Steven A. Wasserman, Peter V. Minorsky and Jane B. Reece NAC. *Biology: A Global Approach*, 11th Global Edition. 11<sup>o</sup> ed. GLOBAL EDITION; 2017. 1152 p.
7. Aljuhani TA, Shaik NA, Alqawas RT, Bokhary RY, Al-Mutadares M, Al Mahdi HB, et al. Exploring somatic mutations in BRAF, KRAS, and NRAS as therapeutic targets in Saudi colorectal cancer patients through massive parallel sequencing and variant classification. *Front Pharmacol*. 20 de novembro de 2024;15:1498295.
8. Mármol I, Sánchez-de-Diego C, Pradilla Dieste A, Cerrada E, Rodriguez Yoldi M. Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci*. 19 de janeiro de 2017;18(1):197.
9. Cornish AJ, Gruber AJ, Kinnersley B, Chubb D, Frangou A, Caravagna G, et al. The genomic landscape of 2,023 colorectal cancers. *Nature*. 5 de setembro de 2024;633(8028):127–36.
10. Yu H, Hemminki K. Genetic epidemiology of colorectal cancer and associated cancers. *Mutagenesis*. 11 de julho de 2020;35(3):207–19.
11. Hampel H, Kalady MF, Pearlman R, Stanich PP. Hereditary Colorectal Cancer. *Hematol Oncol Clin North Am*. junho de 2022;36(3):429–47.
12. Seppälä TT, Burkhart RA, Katona BW. Hereditary colorectal, gastric, and pancreatic cancer: comprehensive review. *BJS Open*. 5 de maio de 2023;7(3):zrad023.
13. Yang L, Wang S, Lee JJK, Lee S, Lee E, Shinbrot E, et al. An enhanced genetic model of colorectal cancer progression history. *Genome Biol*. dezembro de 2019;20(1):168.
14. Sinicrope FA. Increasing Incidence of Early-Onset Colorectal Cancer. Longo DL, organizador. *N Engl J Med*. 21 de abril de 2022;386(16):1547–58.
15. Sinicrope FA. Increasing Incidence of Early-Onset Colorectal Cancer. Longo DL, organizador. *N Engl J Med*. 21 de abril de 2022;386(16):1547–58.
16. Chalabi M, Verschoor YL, Tan PB, Balduzzi S, Van Lent AU, Grootsholten C, et al. Neoadjuvant Immunotherapy in Locally Advanced Mismatch Repair–Deficient Colon Cancer. *N Engl J Med*. 6 de junho de 2024;390(21):1949–58.
17. Williams CJM, Peddle AM, Kasi PM, Seligmann JF, Roxburgh CS, Middleton GW, et al. Neoadjuvant immunotherapy for dMMR and pMMR colorectal cancers: therapeutic strategies and putative biomarkers of response. *Nat Rev Clin Oncol*. dezembro de 2024;21(12):839–51.
18. Aljuhani TA, Shaik NA, Alqawas RT, Bokhary RY, Al-Mutadares M, Al Mahdi HB, et al. Exploring somatic mutations in BRAF, KRAS, and NRAS as therapeutic targets in Saudi colorectal cancer patients through massive parallel sequencing and variant classification. *Front Pharmacol*. 20 de novembro de 2024;15:1498295.

19. Feliu J, Gámez-Pozo A, Martínez-Pérez D, Pérez-Wert P, Matamala-Luengo D, Viñal D, et al. Functional proteomics of colon cancer Consensus Molecular Subtypes. *Br J Cancer*. 1º de junho de 2024;130(10):1670–8.
20. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, De Reyniès A, Schlicker A, Soneson C, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med*. novembro de 2015;21(11):1350–6.
21. Fessler E, Medema JP. Colorectal Cancer Subtypes: Developmental Origin and Microenvironmental Regulation. *Trends Cancer*. setembro de 2016;2(9):505–18.
22. Mouillet-Richard S, Cazelles A, Sroussi M, Gallois C, Taieb J, Laurent-Puig P. Clinical Challenges of Consensus Molecular Subtype CMS4 Colon Cancer in the Era of Precision Medicine. *Clin Cancer Res*. 3 de junho de 2024;30(11):2351–8.
23. Tomlinson I, Cornish A, Gruber A, Houlston R, Sud A, Law P, et al. Whole genome sequencing of 2,023 colorectal cancers reveals mutational landscapes, new driver genes and immune interactions [Internet]. In Review; 2022 [citado 7 de junho de 2025]. Disponível em: <https://www.researchsquare.com/article/rs-2273265/v1>
24. Li Q, Geng S, Luo H, Wang W, Mo YQ, Luo Q, et al. Signaling pathways involved in colorectal cancer: pathogenesis and targeted therapy. *Signal Transduct Target Ther*. 7 de outubro de 2024;9(1):266.
25. Prasetyanti PR, Zimmerlin CD, Bots M, Vermeulen L, De Sousa E Melo F, Medema JP. Regulation of stem cell self-renewal and differentiation by Wnt and Notch are conserved throughout the adenoma-carcinoma sequence in the colon. *Mol Cancer*. dezembro de 2013;12(1):126.
26. Sharma A, Mir R, Galande S. Epigenetic Regulation of the Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling Pathway in Cancer. *Front Genet*. 6 de setembro de 2021;12:681053.
27. Zhao H, Zhao C, Li H, Zhang D, Liu G. E2A attenuates tumor-initiating capacity of colorectal cancer cells via the Wnt/beta-catenin pathway. *J Exp Clin Cancer Res*. dezembro de 2019;38(1):276.
28. Qiu L, Sun Y, Ning H, Chen G, Zhao W, Gao Y. The scaffold protein AXIN1: gene ontology, signal network, and physiological function. *Cell Commun Signal*. 30 de janeiro de 2024;22(1):77.
29. Fang JY, Richardson BC. The MAPK signalling pathways and colorectal cancer. *Lancet Oncol*. maio de 2005;6(5):322–7.
30. Singh H, Li YY, Spurr LF, Shinagare AB, Abhyankar R, Reilly E, et al. Molecular Characterization and Therapeutic Targeting of Colorectal Cancers Harboring Receptor Tyrosine Kinase Fusions. *Clin Cancer Res*. 15 de março de 2021;27(6):1695–705.

31. Stefani C, Miricescu D, Stanescu-Spinu II, Nica RI, Greabu M, Totan AR, et al. Growth Factors, PI3K/AKT/mTOR and MAPK Signaling Pathways in Colorectal Cancer Pathogenesis: Where Are We Now? *Int J Mol Sci.* 23 de setembro de 2021;22(19):10260.
32. Tsaousis GN, Papadopoulou E, Apessos A, Agiannitopoulos K, Pepe G, Kampouri S, et al. Analysis of hereditary cancer syndromes by using a panel of genes: novel and multiple pathogenic mutations. *BMC Cancer.* dezembro de 2019;19(1):535.
33. De Carvalho AC, De Mattos Pereira L, Datorre JG, Dos Santos W, Berardinelli GN, Matsushita MDM, et al. Microbiota Profile and Impact of *Fusobacterium nucleatum* in Colorectal Cancer Patients of Barretos Cancer Hospital. *Front Oncol.* 29 de agosto de 2019;9:813.
34. Gil Ferreira C, Aran V, Zalcborg-Renault I, Victorino AP, Salem JH, Bonamino MH, et al. KRAS mutations: variable incidences in a Brazilian cohort of 8,234 metastatic colorectal cancer patients. *BMC Gastroenterol.* dezembro de 2014;14(1):73.
35. Dos Santos W, Sobanski T, De Carvalho AC, Evangelista AF, Matsushita M, Berardinelli GN, et al. Mutation profiling of cancer drivers in Brazilian colorectal cancer. *Sci Rep.* 23 de setembro de 2019;9(1):13687.
36. Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, et al. Integrative Analysis of Complex Cancer Genomics and Clinical Profiles Using the cBioPortal. *Sci Signal [Internet].* 2 de abril de 2013 [citado 17 de junho de 2025];6(269). Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/scisignal.2004088>
37. Ryland GL, Doyle MA, Goode D, Boyle SE, Choong DYH, Rowley SM, et al. Loss of heterozygosity: what is it good for? *BMC Med Genomics.* dezembro de 2015;8(1):45.
38. Chakravarty D, Gao J, Phillips S, Kundra R, Zhang H, Wang J, et al. OncoKB: A Precision Oncology Knowledge Base. *JCO Precis Oncol.* novembro de 2017;(1):1–16.
39. Surh YJ. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat Rev Cancer.* dezembro de 2003;3(10):768–80.
40. APC [Internet]. [citado 1º de junho de 2025]. Disponível em: <https://www.oncokb.org/gene/APC>
41. Peifer M. Cancer, Catenins, and Cuticle Pattern: a Complex Connection. *Science.* 10 de dezembro de 1993;262(5140):1667–8.
42. Worthley DL, Phillips KD, Wayte N, Schrader KA, Healey S, Kaurah P, et al. Gastric adenocarcinoma and proximal polyposis of the stomach (GAPPS): a new autosomal dominant syndrome. *Gut.* maio de 2012;61(5):774–9.

43. Weiss JM, Gupta S, Burke CA, Axell L, Chen LM, Chung DC, et al. NCCN Guidelines® Insights: Genetic/Familial High-Risk Assessment: Colorectal, Version 1.2021. J Natl Compr Cancer Netw JNCCN. 15 de outubro de 2021;19(10):1122–32.
44. Su Z, El Hage M, Linnebacher M. Mutation patterns in colorectal cancer and their relationship with prognosis. Heliyon. setembro de 2024;10(17):e36550.
45. Fearnhead NS. The ABC of APC. Hum Mol Genet. 1º de abril de 2001;10(7):721–33.
46. OncoKB/gene/APC-K1182\* [Internet]. [citado 10 de junho de 2025]. Disponível em: [https://www.oncokb.org/gene/APC/K1182\\*](https://www.oncokb.org/gene/APC/K1182*)
47. Peng H, Ying J, Zang J, Lu H, Zhao X, Yang P, et al. Specific Mutations in APC, with Prognostic Implications in Metastatic Colorectal Cancer. Cancer Res Treat. 15 de outubro de 2023;55(4):1270–80.
48. OncoKB, gene APC-G471\* [Internet]. [citado 10 de junho de 2025]. Disponível em: [https://www.oncokb.org/gene/APC/G471\\*](https://www.oncokb.org/gene/APC/G471*)
49. Li B, Zhang G, Xu X. APC mutation correlated with poor response of immunotherapy in colon cancer. BMC Gastroenterol. 28 de março de 2023;23(1):95.
50. National Center for Biotechnology Information. ClinVar - NM\_000038.6(APC):c.637C>T (p.Arg213Ter) AND Hereditary cancer-predisposing syndrome. [Internet]. ClinVar; 2025 [citado 10 de junho de 2025]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/265489022/>
51. KRAS G12D [Internet]. [citado 1º de junho de 2025]. Disponível em: <https://www.oncokb.org/gene/KRAS/Gly12Asp>
52. KRAS.
53. Zehir A, Benayed R, Shah RH, Syed A, Middha S, Kim HR, et al. Mutational landscape of metastatic cancer revealed from prospective clinical sequencing of 10,000 patients. Nat Med. junho de 2017;23(6):703–13.
54. Awad MM, Liu S, Rybkin II, Arbour KC, Dilly J, Zhu VW, et al. Acquired Resistance to KRAS<sup>G12C</sup> Inhibition in Cancer. N Engl J Med. 24 de junho de 2021;384(25):2382–93.
55. The AACR Project GENIE Consortium, The AACR Project GENIE Consortium, André F, Arnedos M, Baras AS, Baselga J, et al. AACR Project GENIE: Powering Precision Medicine through an International Consortium. Cancer Discov. 1º de agosto de 2017;7(8):818–31.
56. Nagashima T, Yoshinari T, Nishizono Y, Tasaki M, Inamura K, Ishioka H, et al. Abstract 5735: Novel KRAS G12D degrader ASP3082 demonstrates in vivo, dose-dependent KRAS degradation, KRAS pathway inhibition, and antitumor efficacy in multiple KRAS G12D-mutated cancer models. Cancer Res. 4 de abril de 2023;83(7\_Supplement):5735–5735.

57. Smith G, Bounds R, Wolf H, Steele RJC, Carey FA, Wolf CR. Activating K-Ras mutations outwith 'hotspot' codons in sporadic colorectal tumours – implications for personalised cancer medicine. *Br J Cancer*. fevereiro de 2010;102(4):693–703.
58. Caeser R, Collord G, Yao WQ, Chen Z, Vassiliou GS, Beer PA, et al. Targeting MEK in vemurafenib-resistant hairy cell leukemia. *Leukemia*. fevereiro de 2019;33(2):541–5.
59. KRAS G12R [Internet]. [citado 1º de junho de 2025]. Disponível em: <https://www.oncokb.org/gene/KRAS/Gly12Arg>
60. Takahashi M, Koi M, Balaguer F, Boland CR, Goel A. MSH3 Mediates Sensitization of Colorectal Cancer Cells to Cisplatin, Oxaliplatin, and a Poly(ADP-ribose) Polymerase Inhibitor. *J Biol Chem*. abril de 2011;286(14):12157–65.
61. Adam R, Spier I, Zhao B, Kloth M, Marquez J, Hinrichsen I, et al. Exome Sequencing Identifies Biallelic MSH3 Germline Mutations as a Recessive Subtype of Colorectal Adenomatous Polyposis. *Am J Hum Genet*. agosto de 2016;99(2):337–51.
62. Morak M, Käsbauer S, Kerscher M, Laner A, Nissen AM, Benet-Pagès A, et al. Loss of MSH2 and MSH6 due to heterozygous germline defects in MSH3 and MSH6. *Fam Cancer*. outubro de 2017;16(4):491–500.
63. RAD51D [Internet]. [citado 3 de junho de 2025]. Disponível em: <https://www.oncokb.org/gene/RAD51D>
64. Zhang H, Xu J, Long Y, Maimaitijiang A, Su Z, Li W, et al. Unraveling the Guardian: p53's Multifaceted Role in the DNA Damage Response and Tumor Treatment Strategies. *Int J Mol Sci*. 1º de dezembro de 2024;25(23):12928.
65. Aubrey BJ, Kelly GL, Janic A, Herold MJ, Strasser A. How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression? *Cell Death Differ*. janeiro de 2018;25(1):104–13.
66. Marei HE, Althani A, Afifi N, Hasan A, Caceci T, Pozzoli G, et al. p53 signaling in cancer progression and therapy. *Cancer Cell Int*. dezembro de 2021;21(1):703.
67. Friedler A, DeDecker BS, Freund SMV, Blair C, Rüdiger S, Fersht AR. Structural Distortion of p53 by the Mutation R249S and its Rescue by a Designed Peptide: Implications for "Mutant Conformation". *J Mol Biol*. fevereiro de 2004;336(1):187–96.
68. Suad O, Rozenberg H, Brosh R, Diskin-Posner Y, Kessler N, Shimon LJW, et al. Structural Basis of Restoring Sequence-Specific DNA Binding and Transactivation to Mutant p53 by Suppressor Mutations. *J Mol Biol*. janeiro de 2009;385(1):249–65.
69. NQO1 [Internet]. [citado 3 de junho de 2025]. Disponível em: <https://www.genecards.org/Search/Keyword?queryString=NQO1>

70. Li Q, Geng S, Luo H, Wang W, Mo YQ, Luo Q, et al. Signaling pathways involved in colorectal cancer: pathogenesis and targeted therapy. *Signal Transduct Target Ther.* 7 de outubro de 2024;9(1):266.